

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E. A. P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Control biológico in vitro de Botrytis cinerea (Pers)  
mediante el uso de hongos antagonistas, en vid (Vitis  
vinifera)**

**TESIS**

para optar el título profesional de Biólogo con Mención en Microbiología y  
Parasitología

**AUTORA**

**Miriam Estela Memenza Zegarra**

**Lima-Perú**

**2009**

## **DEDICATORIA**

### **A DIOS**

Quien siempre me acompaña, por permitirme culminar una etapa de mi vida.

### **A mi madre**

Estela Zegarra Sánchez por su amor y por su constante y valioso apoyo en toda mi vida personal y profesional.

### **A mis hermanos**

Por su confianza, comprensión y cariño que siempre han demostrado.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi pleno reconocimiento al Ph.D. Pedro Luis Castellanos Sánchez, profesor investigador de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, por su ayuda invaluable en la elaboración de la presente tesis, a él mi eterna gratitud.

A los Ings. Carlos Torres Limache y Betty Matos Nonogawa, especialistas del Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA), por su apoyo y sugerencias, paciencia, confianza y amistad recibida.

Al Mg. Claudio Sixto Cajahuaringa, por su apoyo metodológico y que siempre estuvo atento a mis inquietudes profesionales.

Al Sr. Napoleón Sánchez Alfaro, por haberme permitido realizar las prácticas en sus viñedos en el caserío de La Huaca.

A mi enamorado, José Manuel Bustamante Agreda, estudiante de Biología, quien me apoyo en la traducción de los artículos científicos y en la preparación de los medios de cultivo.

## ÍNDICE

	Pág.
I.- Resumen .....	6
II.- Introducción.....	8
III.- Antecedentes.....	11
3.1.- El cultivo de la vid.....	11
3.1.1.- Taxonomía y morfología.....	12
3.1.2.- Ecología.....	13
3.1.3.- Importancia económica.....	14
3.2.- <i>Botrytis cinerea</i> Pers o podredumbre gris.....	15
3.2.1.- Taxonomía y morfología.....	15
3.2.2.- Ecología.....	16
3.2.3.- Daño económico.....	17
3.3.- Control biológico de enfermedades.....	19
3.4.- Control biológico de enfermedades aéreas.....	21
3.5.- <i>Trichoderma</i> sp en el control biológico de patógenos de plantas.....	22
3.5.1.- Taxonomía.....	25
3.5.2.- Caracteres culturales y morfológicos.....	26
3.5.3.- Ecología.....	27
3.5.4.- Mecanismos de acción de <i>Trichoderma</i> sp.....	27
3.5.4.1.- Competencia.....	30
3.5.4.2.- Antibiosis.....	31
3.5.4.3.- Micoparasitismo.....	34
3.6.- <i>Trichoderma</i> sp contra <i>Botrytis cinerea</i> Pers.....	36
IV.- Materiales y métodos.....	38
4.1.- Localización del área de estudio.....	38
4.2.- Aislamiento de especies nativas de hongos antagonistas de hojas infectadas de vid.....	38
4.2.1.- Sitio de muestreo.....	38
4.2.2.- Aislamiento de hongos antagonistas de hojas infectadas de vid.....	38
4.3.- Cepa patógena de la vid.....	39

4.4.- Selección de hongos con posibles propiedades antagonicas mediante una prueba de evaluación contra <i>Botrytis cinerea</i> Pers.	39
4.5.- Evaluación de la capacidad antagonica de las cepas seleccionadas contra <i>Botrytis cinerea</i> Pers.....	40
4.6.- Análisis estadístico de la evaluación de la capacidad antagonica de las cepas seleccionadas contra <i>B. cinerea</i> Pers....	41
4.7.- Conservación de las cepas antagonicas y de la cepa patógena.....	41
V.- Resultados.....	42
5.1.- Aislamiento de especies nativas de hongos antagonistas de hojas infectadas de vid.....	42
5.2.- Evaluación de la capacidad antagonica de las cepas de <i>Trichoderma viride</i> contra <i>Botrytis cinerea</i> Pers.....	43
5.2.1.- Análisis de Varianza (ANOVA) y Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey.....	46
VI.- Discusión.....	51
6.1.- Aislamiento de especies nativas de hongos antagonistas de hojas infectadas de vid.....	51
6.2.- Evaluación de la capacidad antagonica de las cepas de <i>Trichoderma viride</i> contra <i>Botrytis cinerea</i> Pers.....	51
6.3.- Análisis de Varianza (ANOVA) y Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey.....	52
VII.- Conclusiones.....	54
VIII.- Ilustraciones.....	55
IX.- Referencias Bibliográficas.....	59
X.- Anexos.....	74

## I. Resumen

En el cultivo de la vid, se reporta a *Botrytis cinerea* Pers como el hongo patógeno causante de lesiones cancras, necrosamiento de brotes y racimos de flores, y pudrición de frutos y semillas, que ocasionan grandes pérdidas económicas a los agricultores. El control de este patógeno se realiza hasta nuestros días con sustancias de origen químico: plaguicidas; los cuales son aplicados al follaje, a las semillas y al suelo, ocasionando problemas en el ambiente.

En el presente trabajo, se colectaron 56 muestras de hojas de vid, infectadas con *Botrytis cinerea* Pers, en un viñedo del caserío La Huaca, en el distrito de San Benito, provincia de Contumaza, departamento de Cajamarca, durante el verano del 2006; de las cuales se aislaron e identificaron 12 cepas de *Trichoderma viride*. En la evaluación de la actividad antagonista de las 12 cepas de *T. viride* sobre *B. cinerea* mediante el método Precolonizado de Placas a 24° C y 28° C, se seleccionó a las cinco cepas: CH-13, CH-25, CH-30, CH-38 y CH-52 que presentaron los mayores porcentajes de área ocupada sobre el patógeno. Estas cepas presentaron actividad antagonista del tipo micoparasitismo, observándose enrollamiento y penetración de las hifas de las cepas de *T. viride* sobre las hifas de *B. cinerea*.

De las cinco cepas seleccionadas de *T. viride*, la cepa CH-30 presentó el mayor porcentaje de área ocupada sobre *B. cinerea* a 24° C y 28° C con un 54.67% y 98% respectivamente.

Por los resultados obtenidos, las cinco cepas nativas de *Trichoderma viride* pueden ser consideradas como una alternativa ecológica para su evaluación como agentes potenciales de control biológico del patógeno *B. cinerea*.

## Abstract

In the culturing of grapevine, there is reported *Botrytis cinerea* Pers as the fungus pathogenic causative of canker injuries, necrotizing of outbreaks and clusters of flowers, and rotting of fruits and seeds, which cause big economic losses to the farmers. The control of this pathogenic is realized actually by substances of chemical origin: pesticides; which are applied to the foliage, to the seeds and to the soil, causing environment problems.

In this present work, there were collected 56 samples of leaves of grapevine, infected with *Botrytis cinerea* Pers, in a vineyard of The Huaca hamlet, in San Benito district, Contumaza province, Cajamarca department, during the summer of 2006; from these ones, there were isolated and identified 12 strains of *Trichoderma viride*. In the evaluation of the antagonist activity of these 12 strains of *T. viride* on *B. cinerea* by the method of Plates pre-colonized in 24° C and 28 °C, was selected five strains: CH-13, CH-25, CH-30, CH-38 and CH-52 that presented the major percentages of occupied area over the fungus pathogenic. These strains showed antagonist activity of mycoparasitism kind, being observed rolling and penetration of mycelium of *T. viride* strains on the mycelium of *B. cinerea*. From 5 *T. viride* strains selected, the CH-30 one showed the major percentage of occupied area on *B. cinerea* in 24° C and 28 °C with 54.67% and 98% respectively.

For the results obtained, five native strains of *Trichoderma viride* can be considered as an ecological alternative for its evaluation as potential agents of biological control of the pathogenic *B. cinerea*.

## II.- Introducción

La fruticultura es una actividad agrícola humana, que en el Perú representa una línea de cultivo emergente; la vid es la especie frutal que ocupa el segundo lugar en exportación (Ministerio de Agricultura, 2008).

Las regiones de Ica, La Libertad, Tacna, Arequipa, Cajamarca y Lima representan las zonas de mayor producción de uva, debido a que poseen un clima tropical y sub-tropical con temperaturas que varían entre 7° y 24°C y humedad relativa entre 70 y 80%; estas características climatológicas favorecen el cultivo de la vid, así como también favorecen la proliferación del hongo patógeno *Botrytis cinerea* Pers, que la ataca produciendo lesiones cancrasas, necrosamiento de brotes y racimos de flores, y pudrición de frutos y semillas, lo que ocasiona grandes pérdidas económicas a los agricultores (Ruesta y Rodríguez, 1992).

El control de estos hongos patógenos actualmente se realiza con sustancias de origen químico: plaguicidas; los cuales son aplicados al follaje, a las semillas y al suelo. Los mayores problemas que ocasionan su uso son:

1. Destrucción de la capa de ozono
2. Contaminación del ambiente, al acumularse los residuos tóxicos en el agua, suelo, plantas y animales.
3. Peligros para la salud de los agricultores cuando se aplican sin ningún tipo de protección y precaución.
4. Enfermedades en humanos y animales cuando se consumen productos vegetales contaminados con residuos tóxicos que pueden producir la muerte.
5. Exterminio de microorganismos benéficos, muchas veces alteran el equilibrio ecológico,
6. Producir resistencia por parte de los patógenos y conversión en plaga a aquellos no considerados como tales.

Esta situación genera la búsqueda de alternativas al uso de los plaguicidas, por lo que la mirada de los investigadores se dirige hacia los microorganismos,



para ser usados como agentes de control biológico, para el control de patógenos de plantas cada vez más.

El control biológico es definido por Garret (1965) como cualquier condición o práctica por medio de la cual la supervivencia o actividad de un patógeno se reduce a través de la mediación de cualquier organismo, excepto el hombre, con disminución de la incidencia de la enfermedad. Para ello, es necesario conocer y entender los sistemas de cultivo, la epidemiología de la enfermedad, la biología, ecología y dinámica de población de los antagonistas, definidos como agentes biológicos capaces de interferir en el ciclo biológico de los patógenos de plantas (Parkinson y Waid, 1960).

El mejor aliado en el control biológico de enfermedades de plantas es la gran variedad de microorganismos nativos factibles de utilizarse. Tanto los hongos como las bacterias, son reconocidos como supresores de patógenos de plantas, limitando la severidad de las enfermedades en los cultivos (Blakeman y Fokkema, 1982; Windels y Lindow, 1985). En el caso de los hongos, los más utilizados son de la clase Hyphomycetes, y de éstos, varias especies del género *Trichoderma* (Jensen y Wolffhechel, 1995).

La capacidad de *Trichoderma* para reducir enfermedades causadas por hongos patógenos de plantas es muy conocida. Los mecanismos considerados importantes en la actividad antagónica de *Trichoderma* son: competencia por nutrientes indispensables para la germinación de esporas o por sitios de infección, el micoparasitismo y en ello el papel de diferentes sustancias, y la antibiosis con la producción de enzimas y metabolitos secundarios que son indispensables en muchas interacciones que causan la destrucción del patógeno (Papavizas, 1985; Fravel, 1988; Benhamou y Chet, 1997). Por otro lado, las especies del género *Trichoderma*, inducen resistencia en la planta hospedera, al estimular las defensas naturales en raíces y hojas de las plantas, así como la mejora de producción de peroxidasas (asociadas con la producción de compuestos fungitóxicos), quitinasas, en la producción de hormonas, en una serie de proteínas asociadas a patogénesis, enzimas hidrolíticas, y en la

síntesis de terpenoides (Yedidia et al., 1999; Stefanova y Sandoval, 1995; Yedidia et al., 2000; Howell et al., 2000).

Ante este problema, hemos visto la necesidad de realizar estudios sobre controladores biológicos efectivos, como el género *Trichoderma*, contra el agente patógeno *Botrytis cinerea* Pers de la vid, proponiendo una alternativa ecológica frente al uso de agroquímicos, cambiando así su dependencia por productos naturales entre los agricultores.

El presente trabajo tuvo como finalidad controlar *in vitro* a *B. cinerea* mediante el uso de hongos antagonistas de la vid, para lo cuál se aisló e identificó hongos con propiedades antagónicas a partir de hojas infectadas con el patógeno, como la especie *Trichoderma viride*, evaluándose las propiedades antagonistas y determinándose las diferencias y la mayor actividad antagónica entre los hongos aislados contra *B. cinerea*.

### **III.- ANTECEDENTES**

#### **3.1.- El cultivo de la vid**

En la conquista de nuevas tierras por España, la vid fue traída al Perú entre los años 1522 y 1555 (Hidalgo, 2002), siendo el primer país en cultivarla y en producir vinos, posteriormente dio origen a la industria vitivinícola de Argentina y Chile.

Según el Inca Garcilazo de la Vega en sus “Comentarios Reales” fue Don Francisco de Carabantes uno de los primeros nobles conquistadores, quien introdujo la vid, y el capitán español, Hernando de Montenegro, el primero en instalar un viñedo. Alrededor del año 1555, en el valle de la concepción, Cuzco, se obtuvo la primera cosecha que se vendió como uva fresca; a partir de este valle se propagó a Huamanga en Ayacucho, Vitor y Majes en Arequipa, Moquegua y Tacna. En Lima, el cultivo de la vid se estableció en el año 1560, con material proveniente de Ayacucho. En el año 1563, la actividad vitivinícola llega a Ica, y ahí la vid fue cultivada en Pisco, Chincha y Nazca para propagarse a la zona norte del país.

En la época colonial, los viñedos llegan a ocupar 36.000 hectáreas, desarrollándose una industria vitivinícola de niveles insospechados que pusieron al Perú en la condición de un importante país exportador de vinos a América Central y del Sur, incluso compitiendo con las producciones de España.

En la época republicana; muchas áreas dedicadas a la vid fueron remplazadas por el cultivo del algodón debido a razones del orden tributario, a la presencia de la filoxera y por la competencia que le hizo el licor de caña, lo que originó que este cultivo se estanque hasta el año 1960 (Ruesta y Rodríguez, 1992). Actualmente, las regiones de Ica, La Libertad, Tacna, Arequipa, Cajamarca y Lima representan las zonas de mayor producción de uva (Ministerio de Agricultura, 2008).

### 3.1.1.- Taxonomía y morfología

La familia Vitaceae comprende catorce géneros vivos y dos fósiles y más de un millar de especies (Pearson, 1988), de las cuales *Vitis vinifera* es la especie más cultivada en el mundo (Galet, 1984); con la siguiente clasificación taxonómica:

Clase: Dicotiledónea

Orden: Rhammales

Familia: Vitaceae

Género: *Vitis*

La vid es una planta herbácea o leñosa, sarmentosa, generalmente de porte rastrero o trepador, cuyo sistema radicular es ramificado y descendente.

El tronco es tortuoso y está cubierto de una corteza más o menos caduca, presenta ramas principales, sarmientos y yemas. De las ramas principales, con características similares al tronco, surgen las ramas secundarias o brotes, que se caracterizan por ser más cortas, no poseer flores ni racimos. Los sarmientos o ramas del año, constituidos por el crecimiento de los brotes después de su maduración, presentan nudos en intervalos regulares, de los cuales surgen las hojas, las yemas y los zarcillos. Las características del pecíolo, brácteas y limbo de las hojas varían según la especie y variedad. Las yemas, formadas por tres brotes parcialmente desarrollados con hojas rudimentarias o con hojas y racimos florales, pueden ser de diferentes tipos tales como: yemas vegetativas, sólo producen hojas; yemas fruteras, las cuales producen hojas y racimos en posición opuesta; yemas axilares, las que salen de la axila de la hoja; yemas latentes, que permanecen inactivas durante una estación o más y yemas adventicias, que se desarrollan en cualquier parte de la planta de la vid.

Los zarcillos, considerados por muchos autores como el abortamiento de una inflorescencia, sirven para sujetar los brotes y protegerlos de la acción del viento. Las flores, presentes en racimo, están constituidas por un eje principal, raquis, que nace individualmente en las ramificaciones o pedicelos de éste; siendo la mayoría de las flores de las variedades comerciales de *V. vinifera* perfectas, con órganos masculinos y femeninos bien desarrollados en la misma flor. El racimo de uvas, con forma regular o irregular; está constituido por el

escobajo, que sirve de soporte a los granos y representa el 5% del peso total del racimo; por los granos, parte carnosa del racimo, constituidos por bayas cuyas características son propias de cada variedad con los principales elementos: azúcares, agua, taninos y ácidos, que representan el 95% del peso total del racimo y; por las semillas (Ruesta y Rodríguez, 1992).

### **3.1.2.- Ecología**

La vid es una planta capaz de adaptarse a lugares con climas muy variados, para prosperar necesita de veranos largos con temperaturas tibias a calientes e inviernos frescos. Por el contrario, no se desarrolla en climas con veranos húmedos debido a su gran susceptibilidad a enfermedades causadas por hongos patógenos.

A temperaturas menores de 10° C, los tejidos de la planta permanecen inactivos, iniciando su brotamiento al calentarse el ambiente por encima de esta temperatura. Por tanto, la acumulación de calor encima de 10° C (grados/días) marca el ciclo del crecimiento del cultivo y determina el comportamiento de las variedades. Así, el clima de la costa es adecuado para el cultivo de la vid, a pesar que las bajas temperaturas en invierno impiden una adecuada maduración de las uvas. En la costa sur se encuentran los viñedos más importantes del país, debido a que los factores ecológicos en esta zona son fundamentalmente más favorables. En la sierra, el cultivo de la vid prospera en los valles interandinos y en la selva, su cultivo es forzado, vegetando durante todo el año.

La latitud, altitud, los vientos y luz solar influyen en el desarrollo del cultivo de la vid, en menor grado que la temperatura; así, un viñedo prospera mejor entre los 35° a 50° latitud norte y entre los 8° a 39° latitud sur, y en altitudes que van desde pocos metros sobre el nivel del mar hasta 1500 msnm. Los vientos fuertes al comienzo de la vegetación producen rotura de los brotes tiernos.

La vid crece en una gran variedad de suelos, prosperando en terrenos sueltos, profundos y con pH de 5.6 a 7.7, permitiendo el crecimiento de un buen sistema radicular. Suelos con un alto porcentaje de sodio (15%) no permiten el normal desarrollo del cultivo.

En nuestro país, los suelos de la costa son adecuados para el cultivo de la vid. El ciclo vegetativo de la vid comprende las siguientes etapas: brotamiento, floración y fecundación, envero, maduración y agoste. El brotamiento, crecimiento de los brotes por resultado de la división de las células y de su agrandamiento, comienza cuando la temperatura fluctúa entre los 10° y 12° C durante dos semanas como mínimo, situación que sucede en los meses de setiembre y octubre. En la floración, los racimos de flores emergen durante la primavera, cuando la temperatura alcanza los 20° a 22° C y con el aumento de la temperatura a 24° C la floración se da rápidamente; debajo de los 15.5° C pocas flores se abren, al contrario, temperaturas entre 35° a 38° C retrasan la floración. En el envero, los frutos inician su crecimiento en forma rápida, manteniendo su color verde para empezar a cambiar de color según la variedad, que van desde el verde a los diversos tonos de amarillo y desde violáceo hasta negro.

A partir del envero comienza el proceso de maduración, en el cuál los frutos aumentan la concentración de azúcares y disminuyen la de los ácidos. En el agoste, gran parte de las sustancias que contienen los órganos que se van a eliminar se trasladan a los órganos que van a permanecer hasta la reiniciación de su actividad en la primavera. En la costa central y sur, por falta de horas de frío, este descanso es deficiente, durando alrededor de tres meses (junio, julio y agosto); y en climas tropicales, la falta de frío invernal no permite a esta especie prosperar ya que todo el año se encuentra en actividad (Ruesta y Rodríguez, 1992).

### **3.1.3.- Importancia económica**

Desde un punto de vista médico – farmacológico, la utilidad de la uva se ha incrementado notablemente, ya que se ha demostrado que las antocianinas

presentes en hojas, frutos y en el aceite de la semilla poseen marcadas propiedades cardiotónicas (Decendit y Merillon, 1996) y cuya función biológica radica en proporcionar permeabilidad y resistencia a los capilares sanguíneos (Bruneton, 1991). Asimismo, las antocianinas constituyen colorantes atóxicos que se utiliza actualmente en la industria alimentaria y de medicamentos (Lock, 1997).

En el Perú, el cultivo de la vid constituye una de las actividades agrícolas de mayor importancia económica, con sus principales variedades Italia, Cardinal, River, Quebranta, Thompson y Flame; en el 2006, representaron la segunda fruta de exportación con un ingreso total de \$48.6 millones.

Estados Unidos representa el principal mercado de destino seguido de países bajos e Inglaterra. Así también, la uva representa un producto con importancia potencial en los mercados asiáticos Hong Kong y Taiwán, y en los mercados latinoamericanos como Colombia, Venezuela, Guatemala y Puerto Rico (Ministerio de Agricultura, 2008).

### **3.2.- *Botrytis cinerea* Pers o podredumbre gris**

La podredumbre gris de racimos de vid, causado por *Botrytis cinerea* Pers, presente en todos los viñedos alrededor del mundo, fue considerado por mucho tiempo como una enfermedad secundaria al no causar pérdidas económicas significativas, sin embargo rápidamente adquirió importancia en Europa después de una epidemia de insectos succionadores de savia (filoxera) y de la reorganización de viñedos con injertos (Pearson, 1988).

#### **3.2.1.- Taxonomía y morfología**

Clase: Hypomicetes

Orden: Moniliales

Familia. Botrytidaceae

Género: *Botrytis*

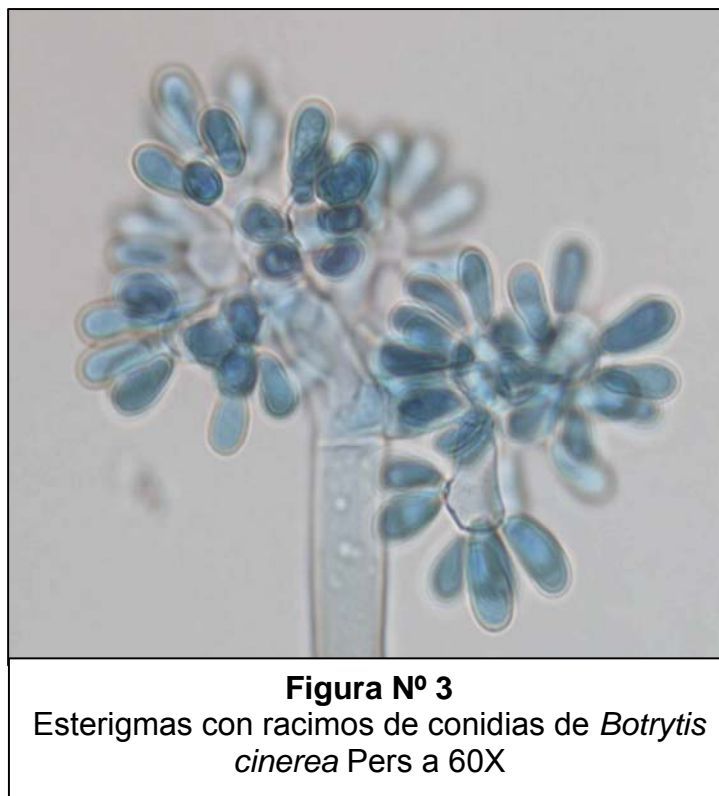
Las colonias de *B. cinerea* Pers crecen rápidamente sobre diversos medios de cultivo y son de color olivo parduzco (Figura N° 1).



*B. cinerea* presenta conidióforos, estructuras especializadas para la producción de esporas, que se caracteriza por tener un tamaño de 2 x 1-3 mm, ser fuertes, delgados y ramificados con células apicales que portan racimos de conidias en esterigmas cortos. Las conidias son ovoides o globosas, lisas, unicelulares, de ligero color ceniza y gris en masa de 10 -12 x 8 - 10  $\mu$ m. (Figura N° 2 y 3).







**Figura Nº 3**  
Esterigmas con racimos de conidias de *Botrytis cinerea* Pers a 60X

Bajo condiciones adversas el hongo produce esclerocios de 2 – 4 x 1 – 3 mm, oscuros, discordes y firmemente unidos al sustrato. Constan de una médula y una oscura capa cortical de células. Los esclerocios germinan a temperaturas de 3° a 27° C con producción de conidióforos (Pearson, 1988).

### 3.2.2.- Ecología

En el crecimiento y desarrollo de la vid, una gran variedad de microorganismos invaden la superficie aérea de la planta, siendo las fuentes de contaminación el suelo, aire, semillas, etc. De la gran variedad de microorganismos que establecen contacto con la planta, sólo una pequeña parte se comporta como un patógeno, capaz de producir enfermedades en las plantas originando el desequilibrio de sus actividades fisiológicas, repercutiendo drásticamente en su crecimiento, vitalidad, producción e incluso causándole la muerte, siendo cualquier microorganismo como hongos, bacterias, nemátodos y virus (Baker y Cook, 1974).

Dentro de un viñedo, *B. cinerea* Pers esta presente a través de varias fuentes de inóculo, biomasa del patógeno, bajo la forma de esporas, esclerotios y micelio disponibles para la infección; que establecen contacto con heridas de poda (Thomas et al., 1983), tejidos necrosados (Emmett y Nair, 1991) y con el suelo (Seyb, 2004). El hongo patógeno inicialmente se alimenta de los nutrientes endógenos de su espora, para posteriormente alimentarse de los nutrientes emanados de los tejidos vivos, necróticos, senescentes o muertos de la planta (saprófito), antes de la formación de una estructura de infección. Durante el invierno, la gran capacidad saprofítica de *Botrytis* le permite sobrevivir sobre la vid y un diverso rango de plantas hospederas (Bisiach et al., 1984; Sutton, 1991).

La formación de conidias a partir de micelio y esclerotios que germinan para formar micelio, conidióforos y conidias, proveen un abundante inóculo para la infección de tejidos florales, bayas, retoños y hojas de vid, durante la primavera (McClellan y Hewitt, 1973; Nair y Hill, 1992). Los tejidos florales senescentes son altamente susceptibles a *B. cinerea* Pers (Keller et al., 2003). En esta etapa, la temperatura y humedad relativa son las condiciones climáticas que afectan la formación de esporas. La temperatura y humedad relativa óptima para su producción es de 15°C y 90% respectivamente (Jarvis, 1962).

Durante el crecimiento activo, *B. cinerea* Pers produce un conjunto de enzimas hidrolíticas y metabolitos que facilitan la penetración y colonización del tejido hospedero (Kars y Van Kan, 2004). Al inicio, las defensas físicas y químicas del hospedero limitan la dispersión del hongo patógeno, el cual entra en una fase latente o quiescente. En las bayas, *B. cinerea* Pers permanece en estado latente hasta el cambio de color y comienzo de maduración del fruto, completando su desarrollo patogénico a medida que las defensas del hospedero declinan (Pezet y Pont, 1992; Nunan et al., 1998), causando pudrición del fruto y en algunos casos afectando las semillas (Jarvis, 1997). Los síntomas de esta enfermedad aparecen cuando las bayas tienen 8% de sólidos solubles y concurren condiciones climáticas favorables. El ataque de mayor gravedad ocurre en los racimos (Hidalgo, 2002).

Al final de la estación, la infección de bayas sigue elevándose, particularmente en aquellas con heridas por insectos o pájaros y resquebrajadas durante la

cosecha, a partir de una infección directa por esporas o micelio que crece saprofiticamente sobre flores y frutos estériles abortados dentro del racimo (Nair y Parker, 1985; Nair y Hill, 1992; Latorre y Rioja, 2002); también son frecuentes las infecciones durante la brotación y floración, produciendo lesiones cancrasas y necrosamiento de brotes y racimos de flores (Bulit y Dubos, 1988; Latorre, 1986).

### **3.2.3.- Daño económico**

*Botrytis cinerea* Pers, agente causal de la pudrición gris de la vid, ampliamente distribuido en el mundo (Ellis, 1971), ocasiona grandes pérdidas económicas tanto en uva de mesa como en variedades destinadas a la vinificación, especialmente en zonas con climas templados y húmedos durante la cosecha, que favorecen el desarrollo y proliferación de *Botrytis* sobre restos de hojas necrosadas y en racimos maduros de vid (Bulit y Dubos, 1988; Latorre, 1986; Latorre y Vásquez, 1996). Adicionalmente, ocurren infecciones latentes, las que tienen importancia como fuente de inóculo para el posterior desarrollo de esta enfermedad, particularmente en la post cosecha de la uva de mesa (Latorre y Vásquez, 1996; Latorre et al., 2001).

### **3.3.- Control biológico de enfermedades**

La mayoría de las enfermedades en campo son manejadas con sustancias de origen químico, los plaguicidas, los cuales se aplican en el suelo, semillas, follaje y frutos. Los mayores problemas que se presentan por el uso de estos productos químicos son: el deterioro de la salud humana y del ambiente, la resistencia por parte de los patógenos a los plaguicidas y la residualidad de estos productos que contaminan el agua, suelo, plantas y animales. Esta situación ha provocado la búsqueda de otras formas de control de los patógenos de plantas; así, el control biológico, definido como cualquier condición o práctica por medio de la cual la supervivencia o actividad de un patógeno se reduce a través de la mediación de cualquier otro organismo,

excepto el hombre, con disminución de la incidencia de la enfermedad, ha sido una alternativa de reemplazo al uso de plaguicidas.

Los investigadores han enfocado los trabajos para entender principalmente la ecología y epidemiología de los patógenos de plantas, así como también de los microorganismos benéficos o antagonistas, definido como agentes biológicos capaces de interferir en el ciclo biológico de los patógenos de plantas (Parkinson y Waid, 1960; Garret, 1965; Batra, 1982; Wilson, 1997; Gangawane, 1997; Fry y Milgroom, 1990; Ho, 2000; O'Keeffe y Farrell, 2000; Kookana y Simpson, 2000).

El control biológico involucra un conocimiento completo de los sistemas de cultivo, epidemiología de la enfermedad, biología, ecología y dinámica de población de los antagonistas y la interacción entre todos estos factores (Garret, 1965; Adams, 1990; Deacon, 1991).

El control de fitopatógenos del suelo, utilizando antagonistas, recibió más atención en un principio que los patógenos que atacan partes aéreas de las plantas (foliares y florales); así, entre los antagonistas utilizados en el control biológico de patógenos del suelo, causantes de enfermedades como: secadera, pudriciones de la raíz y de la corona, así como marchitez vascular, tenemos a: *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pythium*, *Laetisaria*, *Sporidesmium*, *Coniothyrium*, *Verticillium* y *Talaromyces* (Nelson, 1991). Contra enfermedades por patógenos de la parte aérea y almacén como: tizones y manchas foliares, royas, cenicillas, mildius, tizón y cáncer de tallo, pudrición de fruto y decaimiento de árboles, los antagonistas evaluados pertenecen a los géneros: *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Ampelomyces*, *Scytalidium*, *Tuberculina*, *Verticillium*, *Eudarluka*, *Darluka*, *Enterobacter*, *Coniothyrium*, *Peniophora*, *Fusarium* y *Cryphonectria* (Nelson, 1991).

### **3.4.- Control biológico de enfermedades aéreas**

La superficie de partes aéreas de las plantas proveen un hábitat para el desarrollo de microorganismos epifíticos, esta microflora natural aérea está compuesta principalmente de levaduras, hongos y bacterias, los cuales se desarrollan exponencialmente dependiendo de los nutrientes. En equilibrio ecológico, tales poblaciones reducen la infección por parte de los patógenos en un 50%, por la competencia de nutrientes en las hojas; sin embargo, bajo condiciones de campo, el incremento de la resistencia a fungicidas por estos patógenos se explica, entre otros factores, por la reducción de la microflora antagonista nativa (Fokkema, 1983).

No obstante que la mayoría de los fungicidas son efectivos contra la mayor parte de los hongos patógenos de partes aéreas, existen reportes de resistencia a estos, por lo menos 72 especies de hongos a 62 productos y cada vez más frecuente a los benzamidazoles, dicarboxiamidas y productos a base de cobre (Fry y Milgroom, 1990; Gangawane, 1997; Wilson, 1997), esto obliga a desarrollar cada vez más productos a base de organismos benéficos contra patógenos de enfermedades foliares, florales y de post cosecha (Wilson, 1997).

Se conocen pocos casos exitosos del control biológico de fitopatógenos del follaje o parte aérea de la planta en la naturaleza, debido a que el biocontrol en este hábitat es más difícil que se logre y por considerarse muchos factores, entre ellos: un adecuado hábitat para el crecimiento del agente de biocontrol, que éstos sean capaces de atacar a los patógenos y conocer los mecanismos de acción del antagonista (Andrews, 1990).

Entre los antagonistas evaluados contra patógenos de la parte aérea y almacén donde se tienen resultados satisfactorios, se encuentran varias especies del género *Trichoderma* (Nelson, 1991).

### 3.5.- *Trichoderma* sp en el control biológico de patógenos de plantas

El parasitismo de hongos sobre hongos patógenos fue un mecanismo conocido en un amplio rango de hongos, pero no fue hasta el año 1932, con los trabajos de Weindling, en que fue reconocido el valor potencial de especies de género *Trichoderma* como agentes de biocontrol de enfermedades de plantas, al observar a *Trichoderma viride* como parásito de un gran número de hongos patógenos del suelo como *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora*, *Pythium* y *Sclerotium rolfsii*.

La importancia de este hongo se fortaleció recién a partir de la aparición de problemas ecológicos y económicos, al rápido desarrollo de la biotecnología en agricultura, y al reconocimiento de *Trichoderma* como un buen agente de biocontrol por su amplia distribución en la naturaleza, su fácil aislamiento y cultivo, su crecimiento rápido sobre muchos sustratos; por poseer diferentes modos de acción contra los fitopatógenos, tales como: ser parásitos de hongos (micoparásitos), competir por espacio y alimento y, por producir antibióticos y enzimas capaces de atacar estructuras vegetativas y reproductivas de los hongos patógenos, y principalmente no ser patógeno de plantas, comenzándose a buscar productos comerciales que utilizaran *Trichoderma* como agente activo de biocontrol.

Las especies más reportadas en el control biológico de fitopatógenos del suelo son: *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma (Gliocladium) virens*, efectivas contra *R. solani*, *Colletotrichum* spp., *S. rolfsii*, *S. sclerotiorum*, *Pythium ultimum*., *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora parasitica*, *Verticillium* spp. y *Thelaviopsis* spp., entre otros (Nelson, 1991; Samuels, 1996).

Bajo condiciones de campo, la especie *T. harzianum* es efectiva contra *R. solani*, y *S. rolfsii* en cacahuete, tomate (Wells et al., 1972), frijol y pepino (Elad et al., 1980). En viveros comerciales se aplica en plántulas de pepino y chile reduciendo problemas por “secadera” en un 67% al transplante y además mejora la calidad de la planta (Inbar et al., 1994).

La especie *Trichoderma hamatum* si se incorpora al suelo tiene potencial como agente de biocontrol, al atacar a *Phythium* spp. y *R. solani*, hongos causantes de “secadera” de plántulas (Chet et al., 1981).

Especies de *Trichoderma*, especialmente *T. harzianum*, crecidos en sustratos sólidos como base alimenticia (preparaciones de salvado de trigo, melaza, ryegrass, entre otros) lograron un control significativo de *S. rolfsii* y *R. solani* en cultivo de maní (Chet et al., 1979). La eficiencia del biocontrol con inoculantes sólidos dependerá de la temperatura, tipo de inóculo usado, tiempo de introducción del antagonista al suelo en relación al tiempo de cosecha (Elad et al., 1980), densidad del inóculo del antagonista (Elad et al., 1981; Hadar et al., 1979) y, la densidad de inóculo del patógeno.

A pesar del biocontrol comprobado de muchas especies de *Trichoderma* contra hongos patógenos del suelo, el principal problema en su uso comercial son las grandes cantidades de material biológico requerido para tratar grandes áreas de suelo (Hadar et al., 1984; Harman et al., 1981), por lo cual se sugirió un método que requiera pequeñas cantidades de material biológico, consiguiéndose al tratar las semillas con *Trichoderma* para luego ser introducidas al suelo (Harman et al., 1981)). El biocontrol del damping-off, marchitamiento de la planta, causado por *R. solani* y *Pythium* spp. en cultivos de arvejas y rabanitos fue logrado al tratar las semillas con conidias de *T. hamatum* (Chet et al., 1981).

Mejoras en la producción de soya en campos infestados con *Rhizoctonia* fue logrado al tratar las semillas con *Trichoderma pseudokoningii* (Wu, 1982) y semillas de maíz y soya con *T. harzianum* (Kommedahl et al., 1981).

Al utilizar la especie *Trichoderma koningii* en el tratamiento de la semilla del trigo, se logra incrementar los rendimientos en primavera e invierno en un 65% y 40% respectivamente, y se reducen las infecciones de la corona de la raíz por *Gaeumannomyces graminis*.

En general, el éxito del control biológico a través del tratamiento de las semillas dependerá de la especie de *trichoderma* usada, la edad de la semilla inoculada, la temperatura del suelo, el tipo de suelo y los microorganismos presentes, el

estado nutricional del inóculo, la densidad poblacional del antagonista en la semilla y la densidad poblacional del patógeno en el suelo (Harman et al., 1980; Kommedahl et al., 1981; Harman et al., 1981; Wu, 1982; Papavizas et al., 1982; Hadar et al., 1984).

El éxito de las especies de *Trichoderma* contra enfermedades de partes aéreas de las plantas en pre y post-cosecha es muy alentador y se empieza a evaluar contra diferentes enfermedades, existiendo trabajos donde se ha comprobado su éxito como agente de biocontrol en enfermedades tales como tizones y manchas foliares, royas, cenicillas, mildius, tizón y cáncer del tallo, pudrición del fruto y decaimiento de árboles, involucrando los siguientes géneros de hongos patógenos *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Poria*, *Cronatium*, *Uromyces*, *Puccinia*, *Melampsora*, *Sphaerotheca*, *Podosphaera*, *Leveillula*, *Cladosporium*, *Botrytis*, *Monilinia*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Heterobasidium*, *Cryphonectria*, *Phellinus* y *Chondrosterum* (Nelson, 1991; Elad, 2000a)

A partir de los numerosos estudios realizados con diferentes especies de *Trichoderma*, se concluyó además que este hongo era capaz de excretar una hormona reguladora, capaz de incrementar la tasa de crecimiento o la eficiencia en la toma de nutrientes por parte de la planta. Baker et al. en 1984 encontraron que al añadir *T. harzianum* a un medio propagativo o al suelo de invernadero en una densidad poblacional mayor a  $10^5$  UFC/g de suelo, significativamente incremento el crecimiento de plántulas de crisantemos y petunias, medido en el peso, tamaño y producción de ramas y flores (comparados con controles sin tratamientos). Usando un medio selectivo se demostró que propágulos vivos de *Trichoderma* están presentes en las raíces de las plantas inoculadas (Elad et al., 1983; Chang et al., 1985). Este efecto positivo del antagonista en el crecimiento y producción de flores en las plantas hace valioso el uso de *Trichoderma* como un agente de biocontrol.

Uno de los agentes más estudiados del control biológico comercial es el fungicida biológico T39 (Trichodex) a base de esporas de *T. harizianum* cuyo modo de acción consiste en competir por espacio y nutrientes secretados por la planta, es considerado como un modelo al demostrar control biológico bajo



condiciones de invernadero (Elad, 2000b). Contra enfermedades de partes aéreas, si se aplica en época de floración logra controlar a *Botrytis cinerea* Pers en árboles de manzano, reduce su incidencia en 36% en uva, en un 84% en tomate (O'Nelly et al., 1996), y controla a éste mismo patógeno en cereza y pepino (Wilson, 1997). También controla a *S. sclerotiorum* en invernadero y campo, *Cladosporium fulvum* en tomate y *Sphaerotheca fuliginea* en cucurbitáceas y *Leveillula taurina* en pepino.

Otra especie comercial a base de *Trichoderma harzianum* corresponde al aislado T-315, el cual resultó más efectiva en el control de *Pythium aphanidermatum* que el fungicida Protiocarb, inhibiendo el 83% del crecimiento micelial del patógeno *in vitro* (Sivan et al., 1984).

Krauss e Ince (1998) en su búsqueda de hongos parásitos del patógeno causal de la pudrición de la corona del plátano en hojas secas, aislaron 13 hongos antagonistas entre ellos *Trichoderma* sp, *Gliocladium* sp, *Verticillium* sp y *Pythium* sp. Realizaron pruebas del rango de hospederos, agresividad contra estructuras vivas (conidias y haustorios) y tolerancia a fungicidas; sin embargo no encontraron las características requeridas para un control biológico consistente y sugirieron la combinación de dos o tres antagonistas para obtener mejores resultados. En este sentido, Guetsky et al. (2001), reportan que la combinación de dos agentes de biocontrol reducen la variabilidad e incrementa la efectividad del control biológico.

### **3.5.1.- Taxonomía**

La clasificación taxonómica del género *Trichoderma*, basada en características morfológicas y microscópicas, fue desorganizada y generó confusión desde su establecimiento por Pearson en 1794 con cuatro especies.

En 1969, Rifai agregó nueve especies más y realizó una revisión del género *Trichoderma* estableciendo la siguiente clasificación: Clase: Deuteromycetos, Orden: Moniliales, Familia: Moniliaceae y Género: *Trichoderma*. Luego, los estudios realizados por Doi en 1972, establecieron la relación morfológica entre

*Trichoderma* e *Hypocrea*, haciendo pensar que especies del género *Hypocrea* representan especies de *Trichoderma*.

Alexopoulos y Mims (1979) y Subramanian (1983) propusieron una nueva clasificación taxonómica, ubicando el género *Trichoderma* en: División, Eumycota; Subdivisión, Deuteromycotina; Clase, Hyphomycetes; Orden, Moniliales; Familia, Moniliaceae y Género: *Trichoderma*.

Existe una fuerte evidencia de que el género *Trichoderma*, filogenéticamente es joven y sigue evolucionando con muchas formas intermedias (Lieckfeldt, 1998). A pesar de la evidente importancia económica del género *Trichoderma*, su taxonomía, basada en la morfología, aún es un problema (Samuels, 1996), y se intenta clarificar utilizando técnicas moleculares (Kuhls et al., 1997).

El género *Trichoderma* presenta un promedio de 75 especies descritas (Samuels, 1996; Kuhls et al., 1997); y en 1999, considerando las aportaciones de Rossman et al. su clasificación taxonómica es de la siguiente manera:

División: Eumycota;  
Subdivisión: Ascomycotina;  
Clase: Euascomycetes;  
Orden: Hypocreales;  
Familia: Hypocraceae;  
Género: *Trichoderma*, *Hipocrea*,

### **3.5.2 Caracteres culturales y morfológicos**

Las colonias del género *Trichoderma*, en medio de cultivo, crecen rápidamente, siendo al inicio de color blanco y luego verdes, no hay micelio aéreo y la pigmentación típica es en tonos verdes, verde-amarillos y algunos cultivos presentan un olor parecido al coco (Samuels, 1996).

Las características morfológicas del género *Trichoderma* son: conidióforo hialino muy ramificado no verticilado, fiálides individuales o en grupos, conidias

hialinas o verde oscuro profundo cercano a gris pasando por verde y verde amarillo, unicelulares, de forma ovoide, globosa a subglobosa, elipsoidal u oblonga, nacidas en pequeños racimos terminales, menores de 5 µm de largo y ancho. Las conidias tienden a acumularse dentro de masas pulverulentas. Las clamidosporas tienen forma globosa a subglobosa, terminales o intercalares de tono verde y menores a 15 µm de diámetro (Samuels, 1996)

Las colonias de *T. viride* tienen un rápido crecimiento, cubriendo el medio de cultivo, de una placa de vidrio de 9 cm de diámetro, en cuatro días a 20° C, las conidias son verdes de forma ovoides cortas de 2.8 – 5 x 2.8 – 5 µm. Las conidias de *T. harzianum* Rifai son verdes, de forma subglobosas a ovoides cortas de 2.4 – 3.2 x 2.2 – 2.8 µm (Rifai, 1969).

### 3.5.3.- Ecología

Las especies del género *Trichoderma* son ampliamente distribuidas en todo el mundo (Domsch et al., 1980), se encuentran en casi todos los suelos; en el aire; en partes aéreas de plantas; en humus forestales (Samuels, 1996); en madera en descomposición (Kuhls et al., 1997); en superficies radiculares de varias plantas (Parkinson et al., 1963); sobre corteza caída, especialmente cuando es dañada por otros hongos; y sobre esclerotios y otros propágulos de hongos (Davet, 1979; Wells et al., 1972). Su desarrollo es influenciado por condiciones ambientales (Jensen y Wolffhechel, 1995).

De acuerdo al tipo de suelo, temperatura y contenido de humedad se presentan diferencias entre especies del género *Trichoderma*, y no solo se encuentra una sola especie. La temperatura óptima de crecimiento difiere entre las especies de *Trichoderma*, la mayoría son mesófilas (25° C) y no pueden proteger la germinación de semillas contra hongos patógenos del suelo tolerantes al frío, durante condiciones de frío y humedad del otoño y primavera; así, en suelos forestales, *T. viride* fue muy abundante al principio de la primavera y otoño, mientras que *T. koningii* creció más en verano (Widden y Abitbol, 1980). En suelos secos mantenidos por largos periodos de tiempo, poblaciones de este

hongo disminuyen (Davet, 1979 y 1981). Danielson y Davey (1973) concluyeron que algunas cepas de *T. hamatum* y *T. pseudokoningii* están restringidas a condiciones de excesiva humedad; *T. viride* y *T. polysporum*, restringidas a áreas donde prevalecen bajas temperaturas; *T. harzianum* encontrada comúnmente en regiones de clima cálido; mientras que *T. hamatum* y *T. koningii* están ampliamente distribuidas en áreas de diversas condiciones climáticas.

La abundancia de *Trichoderma* spp en varios suelos, su habilidad para degradar varios sustratos orgánicos en el suelo, su versatilidad metabólica y su resistencia a los inhibidores microbianos, sugieren que estos hongos pueden poseer la habilidad de sobrevivir en muchos nichos ecológicos, dependiendo de las condiciones ambientales predominantes en el ecosistema y de las especies o cepas involucradas (Papavizas, 1985).

Es poco conocido la fase de conidia y clamidospora de *Trichoderma* añadida al suelo o a algún otro ambiente. Algunas de las conidias de *T. harzianum* añadidas al suelo sin suplementos de nutrientes, sobrevivieron entre 110 y 130 días, pero el periodo de sobrevivencia dependerá del aislado utilizado (Papavizas, 1981 y Papavizas et al., 1982). Muchas de las conidias probablemente lisaron antes de la primera germinación, o germinaron en respuesta a los nutrientes liberados de la materia orgánica y subsecuentemente lisaron en ausencia de una base alimenticia adecuada suficiente para soportar el futuro crecimiento y esporulación. Las hifas también pueden sobrevivir en el suelo.

A pesar de la importancia ecológica de las clamidosporas, fueron descartadas en el control biológico en el pasado; sin embargo, existe evidencia de su importancia en la supervivencia del género en el suelo. Caldwell (1958) fue el primero en observar que las clamidosporas sobreviven mejor en el suelo que las conidias. Lewis y Papavizas (1984) demostraron el potencial de varias especies de *Trichoderma* en formar rápidamente un gran número de clamidosporas en suelo o en fragmentos de materia orgánica después de agregar el hongo al suelo, que conidias, además sugirieron que aislados

introducidos tienen el potencial y agresividad para establecerse y colonizar en materia orgánica en ambientes naturales.

La naturaleza fungistática del suelo ((Lockwood ,1977) puede tener un impacto considerable en la supervivencia y dinámica poblacional de especies naturales e introducidas de *Trichoderma*; así las conidias, son, o muy sensibles (Lockwood, 1977) o relativamente insensibles (Mitchell y Dix, 1975) a una fungistasis, esta sensibilidad a la fungistasis fue más pronunciada en suelos neutros o alcalinos que en suelos ácidos (Danielson y Davey, 1973). Parece existir una relación entre el tipo o tamaño del propágulo de *Trichoderma* y su sensibilidad a la fungistasis, se supone que las conidias son más sensibles que las grandes clamidosporas y las hifas menos sensibles que las conidias. La sensibilidad de las clamidosporas es sólo una conjetura ya que se conoce muy poco acerca de su comportamiento en el suelo.

Materias orgánicas pueden ser añadidas al suelo para reducir o anular completamente la fungistasis de este (Lockwood, 1977; Papavizas y Lumsden, 1980). Aún cuando la anulación de la fungistasis sea temporal, acompañado de una base alimenticia enriquecida, permitiría a las esporas germinar y el hongo teóricamente proliferaría en el suelo.

El balance microbiológico del suelo, generalmente referido como equilibrio dinámico, es sujeto de alteraciones mediante varios factores ambientales, incluyendo la aplicación de fungicidas u otras sustancias químicas. El calor o tratamiento químico que elimina grupos de microorganismos, indudablemente, crea un parcial vacío biológico en el suelo (Baker, 1981), la magnitud del cual dependerá del tipo de tratamiento; así, esta alteración puede favorecer el crecimiento de algunas cepas de *Trichoderma* sp en el control de patógenos del suelo, por ejemplo Saksena (1960) demostró que a pesar que *Trichoderma* sp solo fue moderadamente resistente al disulfuro de carbono, su crecimiento fue tan rápido que sobrepasó el de otros hongos.

### **3.5.4.- Mecanismos de acción de *Trichoderma* sp**

Los aspectos más importantes del control biológico, son los mecanismos empleados por especies de *Trichoderma* en el control de enfermedades de plantas. Las investigaciones realizadas indican, que los mecanismos son muy variados; pero, para hacer más efectivo el uso de estos agentes de biocontrol, debemos conocer cómo trabajan estos biocontroladores y cuáles son sus limitaciones.

La capacidad de *Trichoderma* para reducir enfermedades causadas por hongos del suelo es muy conocida. Muchos mecanismos son considerados importantes en la actividad antagónica de *Trichoderma*, entre ellos: competencia por nutrientes indispensables para la germinación de esporas o por sitios de infección, el micoparasitismo y en ello el papel de diferentes sustancias, y la antibiosis con la producción de enzimas y metabolitos secundarios que son indispensables en muchas interacciones que causan la destrucción del patógeno (Papavizas, 1985; Fravel, 1988; Benhamou y Chet, 1997). Por lo tanto, los mecanismos de acción de *Trichoderma* se clasifican en competencia, antibiosis y micoparasitismo.

Las especies del género *Trichoderma*, inducen resistencia en la planta hospedera, al estimular las defensas naturales en raíces y hojas de las plantas; como la mejora de producción de peroxidasas (asociadas con la producción de compuestos fungitóxicos), quitinasas (Yedidia et al., 1999), en la producción de hormonas (Stefanova y Sandoval, 1995), en una serie de proteínas asociadas a patogénesis, enzimas hidrolíticas (Yedidia et al., 2000), y en la síntesis de terpenoides (Howell et al., 2000).

#### **3.5.4.1.- Competencia**

Una gran variedad de microorganismos saprofitos y patógenos, colonizan la superficie de las plantas, para soportar el crecimiento de estos microorganismos, las plantas emanan nutrientes, principalmente carbono,

nitrógeno, hierro y factores de crecimiento; cuando estos no son suficientes, surge la competencia, entendida como el esfuerzo de dos o más microorganismos para adquirir nutrientes y espacio (sitios de recepción) que cada uno necesita (Baker, 1965), de tal forma que la causa más común de la muerte de un microorganismo es por inanición (Garret, 1965), ya que muchos de estos requieren nutrientes exógenos para germinar, penetrar e infectar el tejido del hospedero (Baker y Griffin, 1995).

La presencia de *Trichoderma* en suelos naturales y agrícolas de todo el mundo, indican a este hongo como un excelente competidor por espacio y recursos nutricionales en la rizosfera; es este sentido, Sivan y Chet (1985) demostraron que *Trichoderma harzianum* T-35 controla a *Fusarium* spp, en varios cultivos, al competir por nutrientes (carbono y nitrógeno) y espacio en la colonización de la rizosfera.

En la superficie de las hojas, la competencia por nutrientes, es el principal mecanismo en el control de bacterias patógenas; siendo variable en el caso de los hongos (Lindow y Wilson, 1998).

#### **3.5.4.2.- Antibiosis**

En 1965, Jackson define a la antibiosis, como la condición por la cual un organismo excreta uno o más metabolitos capaces de tener efectos dañinos sobre otro o más organismos; al respecto, Handelsman y Parke (1989) restringen la definición sólo a aquellas interacciones que involucran compuestos difusibles de bajo peso molecular o antibióticos producidos por un microorganismo que inhiben el desarrollo del otro, esta definición excluye a proteínas y enzimas que matan al organismo; más tarde Baker y Griffin (1995) extienden el alcance de esta definición a “inhibición o destrucción de un organismo por la producción metabólica de otro”, que incluye enzimas hidrolíticas, metabolitos secundarios volátiles y pequeñas moléculas tóxicas.

La antibiosis en *Trichoderma* spp puede efectuarse por la producción de enzimas hidrolíticas y por metabolitos secundarios volátiles o no (Jensen y Wolffhechel, 1995). Las enzimas hidrolíticas son factores importantes que facilitan la habilidad de *Trichoderma* de competir por sustrato y atacar directamente un amplio rango de hongos patógenos de plantas.

La mayoría de los hongos patógenos contienen en su pared celular polímeros estructurales como: quitina y  $\beta$ -1,3-glucanos; en particular, la pared celular de los Basidiomicetes y Ascomicetes contienen principalmente quitina y  $\beta$ -1,3-glucanos (Inbar. y Chet, 1997), mientras que en los Oomycetes es de  $\beta$ -1,3-glucanos, celulosa y muy poca cantidad de quitina (menor al 1% en *Phyitium*); presentándose la quitina en la pared celular del hongo, como una capa microfibrilar primaria o como un complejo interior de capas con glucanos y proteínas (Benhamou y Chet, 1997). La capacidad de *Trichoderma* de producir enzimas hidrolíticas tales como: celulasas, glucanasas, (Bruce et al., 1995), quitinasas, proteasas y xylanases, para disolver o dañar estos polímeros estructurales, causando un efecto adverso sobre el desarrollo y diferenciación de los hongos patógenos, es utilizada en el control biológico.

Rodríguez-Kabana et al. (1978) demostraron que las proteasas juegan un rol importante en la destrucción de la actividad enzimática de *Sclerotium rolfsii*, con mayor actividad en un pH cercano a neutro o neutro, Elad et al. (1983) demostraron que *T. harzianum* fue capaz de adherirse a *S. rolfsii* y *R. solani* mediante clamps o enrollamiento, donde las enzimas quitinasas,  $\beta$ -1,3 glucanasa y celulasas fueron capaces de atacar las paredes celulares de estos hongos.

Las enzimas quitinasas de *T. harzianum* en comparación con otras enzimas son más efectivas que las de las plantas y bacterias contra un amplio rango de patógenos de plantas (Margolles-Clark et al., 1996). Por enzimas hidrolíticas, principalmente quitinasas, *T. harzianum* antagonizó en campo a *Crinipellis perniciosa*, agente causal de la escoba de bruja del cacao (De Marco et al., 2000); así también, *T. viride* mostró ser parásito de hifas de *C. perniciosa*,



reportándose como posible agente de control biológico de ésta enfermedad (Bastos, 1996).

Las  $\beta$ -1,3 glucanasas son enzimas que hidrolizan los enlaces glucosídicos de las cadenas de  $\beta$ -1,3-glucanos (Pan, Ye y Kuc, 1992), así *T. harzianum* secreta esta enzima en presencia de diferentes polímeros de glucosa y paredes celulares de hongos, siendo los niveles secretados proporcionales a la cantidad de estos inductores, participando en la lisis de la pared celular del huésped durante el micoparasitismo (Vázquez-Garcidueñas et al., 1998).

Hadar et al. (1979) reportan mayor producción de glucanasas que de quitinasas por *T. harzianum*, de la misma forma que a mayor cantidad del hongo adicionado al suelo se manifestaba una reducción de *R. solani* y la enfermedad en condiciones de invernadero. En forma similar, Bruce et al. (1995) utilizando cuatro especies diferentes de *Trichoderma* reportan mayor producción de glucanasas que de quitinasas y valores muy diferentes aún entre cepas de la misma especie.

La cantidad de quitinasas, glucanasas, xilanasas y celulasas producidas por los diferentes microorganismos antagónicos es variable y no siempre está relacionada con la habilidad para controlar enfermedades.

La capacidad de *Trichoderma* en producir metabolitos secundarios, importantes en el control biológico, fue demostrado en varios estudios, así Godtfredsen y Vangedal (1965) describieron el antibiótico Trichodermin; Pyke y Dietz (1966), reportaron a dermadin, un ácido monobásico no saturado, activo en contra de un amplio rango de hongos y bacterias gram positivas y gram negativas; y la producción de Gliotoxina y Viridina por *T. virens*, en el control de *P. ultimum* (Howell et al., 1993).

Entre los metabolitos que produce *Trichoderma* spp, el 6-pentil- $\alpha$ -pirona es el más conocido (Collins y Halim, 1972; Cutler et al., 1986) y estudiado debido a su potente actividad antifúngica (Cutler y Hill, 1994). La habilidad de las cepas de *Trichoderma* para producirlo es muy variada entre las diferentes especies,

aún entre cepas de la misma especie; además, una cepa en particular puede producir diferentes metabolitos a diferentes estados de desarrollo según las condiciones de cultivo (Cooney et al., 1997; Cooney y Lauren, 1999).

#### **3.5.4.3.- Micoparasitismo**

El micoparasitismo se define como “la interacción antagónica entre dos hongos”; es decir, el parasitismo de un hongo (hospedero) por otro hongo (micoparásito) a través de una síntesis de exoenzimas hidrolíticas para facilitar la degradación de la pared celular del hospedero (Manocha, 1991; Bruce et al., 1995). Cuando un hongo parásito ataca directamente a un hongo patógeno, en un sistema biótico, es un micoparásito (Inbar y Chet, 1997).

Basado en el modo de micoparasitismo, se dividen en dos grupos: Biotróficos y Necrotróficos (Barnett y Binder, 1973). Los biotróficos tienen un rango de hospedantes restringido y producen estructuras especializadas para absorber los nutrientes, son capaces de obtener nutrientes de la célula viva hospedera (Manocha, 1991; Inbar y Chet, 1997), existen pocos casos de biocontrol de este tipo, entre ellos, *Sporidesmium sclerotivorum* Uecker, Ayers & Adams y *Ampelomyces quisqualis* (Chet et al., 1997).

Los necrotróficos matan a la célula hospedera antes o después de la invasión, al excretar sustancias tóxicas que degradan las paredes celulares del hongo patógeno, y posteriormente utilizan los nutrientes liberados de la célula muerta; son capaces de existir indefinidamente como saprofitos y se caracterizan por su crecimiento rápido sobre una gran variedad de sustratos, tienden a ser más agresivos y presentan un amplio rango de hospedantes extendidos a lo largo de todos los grupos taxonómicos y no son especializados en su modo de parasitismo (Manocha, 1991). Su actividad antagónica es atribuida a la producción de antibióticos, toxinas o enzimas hidrolíticas en proporciones que causan la muerte y destrucción de su hospedero (Inbar y Chet, 1997).

La mayoría de los micoparásitos utilizados en invernaderos y pruebas de campo han sido necrotróficos (Adams, 1990; Whipps, 1992), entre ellos, *Trichoderma* sp, *Phytium* sp, *Talaromyces flavus* (Cloecker) Stolck y Samson, *Coniothyrium minitans*, *Gliocladium* sp (Chet et al. 1997).

Las especies de *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. viride*, *T. longibrachiatum* y *T. hamatum*, se reportan como micoparásitos de *R. solani*, *S. rolfii*, *P. aphanidermatum*, *Phytophthora capsii* Leonina y *Phytophthora nicotianae* Van Breda de Haan, *Rosellinia necatrix* Harting, *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *Fusarium roseum* (Link) emend. Zinder & Hansen, *Botrytis cinerea* Pers, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanish y *Verticillium dahliae* Kleb., entre otros, penetrándolos y causando lisis del micelio (Naár y Keskés, 1995; Stefanova y Sandoval, 1995).

Así mismo, *T. koningii* presenta potencial antagónico *in vitro* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. & Sacc., agente de la antracnosis del fruto de la pasiflora, causándole alteraciones morfofisiológicas en cultivos apareados e inhibiendo el crecimiento del micelio, lo que sugiere la posibilidad de controlar a este patógeno bajo condiciones de campo (Ribamar y De Oliveira, 1998).

La secuencia de pasos que sigue el proceso de micoparasitismo, se puede resumir en el reconocimiento que incluye la localización y crecimiento quimiotrópico, ataque (enrollamiento), lisis (por la excreción de enzimas) y degradación celular del hospedero para adquirir nutrientes (Bruce et al., 1995).

El primer evento denominado reconocimiento esta influenciado por la interacción de carbohidrato - lectina, este paso provee las bases para la interacción específica y es el detonante de una cascada de eventos que eventualmente se dirigen hacia la destrucción del hospedero (Inbar. y Chet, 1997). Entre *Trichoderma* spp. y *S. rolfii*, las lectinas participan en el reconocimiento e interacción, y las  $\beta$ -1-3-glucanasas son necesarias para la aglutinación (Barak et al., 1985; Inbar y Chet, 1997).

Después del crecimiento directo de *Trichoderma* sp hacia el hospedero, probablemente por quimiotropismo positivo (Chet et al., 1981), el contacto se

efectúa en algunos casos al forman estructuras parecidas a ganchos, presumiblemente apresorios, que probablemente permiten la penetración de la hifa en la célula (Elad et al., 1983). Se conoce que *Trichoderma* spp después de reconocer a su hospedero lo ataca, crece en espiral y produce un apresorio el cual auxilia la penetración de la pared celular y en la nutrición del antagonista; también, la capacidad de *T. harzianum* en penetrar esclerocios y degradar su contenido (Henis et al., 1983; Goldman et al., 1994).

### **3.6.- *Trichoderma* sp contra *Botrytis cinerea* Pers**

Una de las características de *B. cinerea* es su fase saprofítica, tan importante como su fase parasítica. En la fase saprofítica, el hongo patógeno coloniza varios fragmentos de la planta, en donde desarrolla abundantemente y obtiene los nutrientes para infectar órganos verdes.

Se planteó la hipótesis que *T. harzianum* puede primero colonizar las partes florales senescentes adheridas a las bayas, previniendo el establecimiento saprofítico de *B. cinerea*. Experimentalmente, se demostró al tratar 600 partes florales con *T. harzianum* y otras como control; los resultados mostraron que el 60.5% de partes florales de los controles contenían a *B. cinerea*, comparado con un 11.5% de la presencia del hongo patógeno en partes florales tratadas. Así también, la acción de *T. harzianum* sobre las conidias y conidióforos desarrolladas a partir de los esclerocios, fue estudiado en condiciones naturales. Los resultados demostraron, que muchos esclerocios fueron destruidos, así como las conidias y conidióforos antes que estos fueran capaces de producir conidias. Estos hechos, incentivaron la búsqueda de especies de *Trichoderma* en contra de *B. cinerea* (Dubos et al., 1978).

La especie *T. harzianum* T 39 (Trichodex), aislado de cucurbitáceas, fue el primer antagonista en ser formulado en un producto comercial para el control de *B. cinerea* (Elad y Shtienberg, 2000) por su gran capacidad competidora de nutrientes, por producir enzimas pectolíticas y por inducir resistencia en la planta hospedera. La eficacia de este producto fue evaluado en 34 variedades

de vid, en 139 viñedos y en 19 países entre los años 1988 y 1994; controlando la enfermedad en un 36% comparado con un 52% de botriocidas estándares, cuando se aplicó sobre cuatro etapas del crecimiento vegetativo de la vid: al final de la floración, en el cierre de los racimos, en el envero y 2 a 3 semanas después del envero.

El producto T-22 a base de *T. harzianum*, utilizado inicialmente para el control de patógenos del suelo y como estimulante del crecimiento de plantas (Harman, 2000; Dissevelt y Ravensberg, 2002); suprimió a *B. cinerea* en plantas de vid, en porcentajes similares a botricidas estándares (Harman et al., 1996; Wilson, 1997). Así también, el aislado *T. harzianum* P1, controló eficazmente la pudrición de racimos de vid por *Botrytis*, equivalente al control por botricidas estándares a base de dicarboximida y vinclozolin (Latorre et al., 1997).

Otro aislado de *T. harzianum* fue seleccionado por su habilidad de colonizar restos florales y tejidos verdes de racimos de vid, siendo estas partes de la planta, lugares potenciales para la infección por *B. cinerea* (Holz et al., 1997). La capacidad colonizadora de *T. harzianum* fue superior al de *Gliocladium roseum*, *Ulocladium atrum* y *Trichosporon pullulans*, en uvas para mesa y vino (Holz y Volkmann, 2002).

El Producto Trichopulvin 25 PU, a base de *T. viride*, aplicado 4 veces en cada etapa de crecimiento de la vid, suprimió eficazmente la pudrición de racimos de uvas (en un 70% a 96%) en comparación a Trichodex (51% a 96%) y al fungicida dicarboximida (Sesan et al., 1999).

## **IV.- MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1.- Localización del área de estudio**

El trabajo de investigación se realizó en dos etapas, la primera etapa fue de campo en un viñedo del caserío La Huaca, en el distrito de San Benito, provincia de Contumazá, departamento de Cajamarca, durante el verano del 2006. La segunda etapa se realizó en el laboratorio S-20 de la Escuela de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

### **4.2.- Aislamiento de especies nativas de hongos antagonistas en hojas infectadas de vid.**

#### **4.2.1.- Sitio de muestreo**

Se realizó una entrevista a los agricultores de la zona acerca de los problemas fitosanitarios y de su control en el cultivo de la vid, se identificó las plantas afectadas por *Botrytis cinerea* Pers, colectándose un total de 56 muestras, cada una compuesta por 5 hojas con síntomas de necrosamiento y crecimiento micelial, las hojas fueron conservadas individualmente en papel toalla, colocadas en bolsas plásticas de primer uso y transportadas al laboratorio en un cooler a temperatura de ambiente.

#### **4.2.2.- Aislamiento de hongos antagonistas de hojas infectadas de vid**

El aislamiento de los hongos antagonistas se realizó colocando las hojas infectadas de vid en cámara húmeda a temperatura de laboratorio. Después de 2 a 3 días, con ayuda del estereoscopio se examinaron las hojas identificándose estructuras fúngicas, tanto en las áreas sanas como en las necrosadas; se realizó un raspado de las esporas para su identificación preliminar en el microscopio. Los hongos sospechosos de tener capacidad antagonista fueron removidos de las hojas, con la ayuda de un asa de siembra

estéril, colocados en Agar Papa Dextrosa (APD) a pH 6.0 y se incubaron a temperatura de laboratorio (25° C) (Cazorla et al., 1998; French y Hebert, 1982).

Para la identificación de las cepas realizamos, evaluaciones macroscópicas, determinando las características de crecimiento del hongo en el medio de cultivo, así como evaluaciones microscópicas en función de la morfología de los hongos y la clave de identificación de Barnett y Barry (2006).

A las cepas aisladas se les asignó el código CH - N - a, b, c ó d donde:

- C: corresponde al lugar de aislamiento (Cajamarca)
- H: a la muestra de donde fue aislada (Hoja)
- N: al número de muestra de donde se aisló y
- a, b, c ó d: representan los diferentes géneros de hongos provenientes de una misma muestra.

#### **4.3.- Cepa patógena de la vid**

La evaluación de capacidad antagónica de las cepas aisladas, se realizó con el hongo patógeno *Botrytis cinerea* Pers, proporcionado por la Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

#### **4.4.- Selección de hongos con posibles propiedades antagónicas mediante una prueba de evaluación contra *Botrytis cinerea* Pers**

De los hongos aislados se seleccionaron hongos con posibles propiedades antagónicas, reportados como agentes de biocontrol por su capacidad antagonista que incluye competencia, antibiosis y/o micoparasitismo (Elmer et al., 2003); teniendo en cuenta estos aspectos, empleamos la metodología propuesta por Krauss e Ince. (1998), para la evaluación de la capacidad antagónica de los hongos seleccionados contra *B. cinerea* Pers.

#### **4.5.- Evaluación de la capacidad antagónica de las cepas seleccionadas contra *Botrytis cinerea* Pers**

Los hongos con posibles propiedades antagónicas fueron enfrentados con la cepa patógena *B. cinerea* Pers.

Para la evaluación de la capacidad antagónica de las cepas seleccionadas frente a *B. cinerea* Pers, se utilizó el Método precolonizado de placas (Krauss e Ince, 1998) en APD a pH. de 6.0.

Las cepas antagonistas y el hongo patógeno *B. cinerea* Pers se sembraron en placas petri con APD a pH de 6.0 incubándose a 25° C por separado. Después de 5 días de haber completado su desarrollo micelial sobre toda la superficie del medio de cultivo de las placas de los hongos antagonistas (PLACA A), se cortó con un bisturí estéril una tira de agar de 0.5 x 2.5cm y se colocó invertida en un extremo de la placa del hongo patógeno (PLACA B). Las placas fueron incubadas a 24 y 28° C con tres repeticiones por cada posible hongo antagonista, en diferentes tiempos.

En la evaluación de la capacidad antagónica de las cepas antagonistas, se elaboró un molde de 5 tiras, cada una de 5 x 12mm que se colocó sobre la base de las placas conteniendo a *B. cinerea* Pers y a la cepa antagonista. Cada 24 horas durante 5 días, una de las tiras de agar fue removida con un bisturí estéril, cortada desde el extremo distal hacia el inóculo del micoparásito. Luego, la tira extraída fue cortada en 15 sucesivos bloques de agar de 5 x 5mm. Los bloques de agar se colocaron en sentido horario en una placa vacía estéril, en la tapa de cada placa se colocó papel toalla de 100mm de diámetro estéril y humedecido. Se realizaron observaciones diarias hasta que el micoparásito fue claramente detectado en el estereoscopio (Ver anexo N° 1).



#### **4.6.- Análisis estadístico de la evaluación de la capacidad antagónica de las cepas seleccionadas contra *B. cinerea* Pers**

En la evaluación de la capacidad antagónica de las cepas antagonistas sobre *B. cinerea* Pers a través del método Precolonizado de Placas, se determinó las diferencias de actividad antagónica entre las cepas seleccionadas y cuales de éstas presentaron mayor antagonismo contra *B. cinerea* Pers a través del Análisis de Varianza (ANOVA) y La Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey.

Se determinó la actividad antagónica de las cepas antagonistas a través del Porcentaje de área ocupada (PAO) y crecimiento micelial diario de los antagonistas sobre el hongo patógeno *B. cinerea* Pers. El porcentaje de área ocupada por las cepas antagonistas se determinó comparando el número de cuadraditos de agar de 25mm<sup>2</sup> de área, cada uno, en que logró crecer el antagonista, con el total de 350mm<sup>2</sup> de área evaluada que represento el 100%. Todos los análisis tuvieron un nivel de confianza del 95%.

Las cepas antagonistas que no crecieron sobre *B. cinerea* Pers no fueron analizadas estadísticamente.

#### **4.7.- Conservación de las cepas antagónicas y de la cepa patógena**

Los hongos aislados fueron conservados en viales con APD en pico de flauta a pH de 6.0 a temperatura de laboratorio (25° C) y resembrados en periodos de 4 meses.

## V.- RESULTADOS

### 5.1.- Aislamiento e identificación de especies nativas de hongos antagonistas en hojas infectas de vid.

De las 56 muestras procesadas se obtuvieron 66 aislamientos (Tabla N° 1), identificándose los géneros *Aspergillus* (con 8 cepas), *Fusarium* (con 14 cepas), *Penicillium* (con 1 cepa), *Chrysosporium* (con 1 cepa), *Alternaria* (con 20 cepas), *Acremonium* (con 5 cepas), *Mucor* (con 1 cepa), *Botrytis* (con 4 cepas) y *Trichoderma* (con 12 cepas). Las 12 cepas aisladas del género *Trichoderma* se identificaron como la especie *T. viride* (Rifai, 1969) (Figura N° 6 – 12), las cuales fueron utilizadas para las pruebas de evaluación de la capacidad antagónica contra *B. cinerea* Pers (Tabla N° 2).

**Tabla N° 1. Cantidad de cepas aisladas de hongos obtenidos a partir de las hojas infectadas de vid**

Género / Especie	Códigos asignados	Número de cepas aisladas	Porcentajes
<i>Aspergillus</i> sp	CH-1c, CH-3b, CH-3c, CH-23c, CH-24a, CH-34, CH-53, CH-54	8	12%
<i>Fusarium</i> sp	CH-1a, CH-3a, CH-4, CH-6, CH-11, CH-12, CH-15, CH-16, CH-17b, CH-18, CH-28, CH-32, CH-33, CH-39	14	21%
<i>Penicillium</i> sp	CH-1b	1	2%
<i>Chrysosporium</i> sp	CH-1d	1	2%
<i>Alternaria</i> sp	CH-2, CH-8, CH-9, CH-10, CH-19, CH-20, CH-23b, CH-37, CH-40, CH-41, CH-42, CH-43, CH-44, CH-45, CH-46, CH-47, CH-48, CH-49, CH-51, CH-55	20	30%
<i>Acremonium</i> sp	CH-5, CH-14, CH-17a, CH-31, CH-36a	5	7%
<i>Mucor</i> sp	CH-29	1	2%
<i>Botrytis</i> sp	CH-7, CH-21, CH-22, CH-50	4	6%
<i>Trichoderma viride</i>	CH-13, CH-23a, CH-24b, CH-25, CH-26, CH-27, CH-30, CH-35, CH-36b, CH-38, CH-52, CH-56	12	18%
<b>Total</b>		<b>66</b>	<b>100%</b>

**Tabla N° 2. Cantidad de cepas aisladas de la especie *T. viride* utilizadas para la evaluación de la actividad antagónica frente a *B. cinerea***

Número	Código
1	CH-13
2	CH- 23a
3	CH- 24b
4	CH- 25
5	CH-26
6	CH-27
7	CH- 30
8	CH-35
9	CH- 36B
10	CH- 38
11	CH-52
12	CH-56

## **5.2.- Evaluación de la capacidad antagónica de las cepas de *T. viride* contra *B. cinerea***

De los hongos aislados de hojas infectadas de vid, sólo se evaluó la capacidad antagónica de las cepas de la especie *T. viride*. No fueron evaluadas, las cepas del género *Alternaria* por ser principalmente, agresivos saprofitos competidores de *B. cinerea*, por nutrientes y espacio en tejidos aéreos necróticos y senescentes en el hospedero, y no por actividad micoparasítica; las cepas del género *Acremonium* y *Chrysosporium*, por no reportarse como micoparásitos contra *B. cinerea* (Elmer et al., 2003); las del género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Mucor*, por ser hongos pudridores de frutos en post cosecha (Pearson, 1988); y las cepas de *Botrytis*, por ser posibles hongos patógenos en la vid (no comprobado mediante pruebas de patogenicidad).

Los porcentajes de área ocupada (PAO) y crecimiento micelial diario de las cepas de *T. viride* sobre el hongo patógeno *B. cinerea* Pers, se presentan en las siguientes tablas:

**Tabla N° 3: Porcentaje del área ocupada por las cepas de *T. viride* sobre *B. cinerea* a 24° C y 28° C**

<b>Cepa</b>	<b>Temperatura/ Tiempo</b>	<b>24 H</b>	<b>48 H</b>	<b>72 H</b>	<b>96 H</b>	<b>120 H</b>
CH-13	24° C	0%	0%	0%	29%	43%
	28° C	14%	32.33%	37.67%	59.33%	92%
CH-25	24° C	0%	0%	7%	23.67%	38.33%
	28° C	0%	9.33%	28.33%	47.67%	97.67%
CH-30	24° C	0%	9.33%	21%	38.33%	<b>54.67%</b>
	28° C	0%	14%	25.67%	57.33%	<b>98%</b>
CH-38	24° C	0%	0%	24.33%	32%	53%
	28° C	0%	11.67%	38.33%	64%	93%
CH-52	24° C	0%	0%	11%	19%	47.67%
	28° C	0%	9.33%	31.33%	52.33%	93%
CH-26	24° C	0%	0%	0%	0%	0%
	28° C	0%	7%	7%	7%	14%
CH-23a	24° C	0%	0%	0%	0%	0%
	28° C	0%	7%	14%	14%	14%
CH-27	24° C	0%	0%	0%	14%	29%
	28° C	0%	9.33%	14%	28.67%	45.33%
CH-35	24° C	0%	0%	0%	14%	29%
	28° C	0%	7%	14%	23.67%	36%
CH-36	24° C	0%	0%	0%	22%	29%
	28° C	0%	0%	4.67%	22%	22%
CH-24b	24° C	0%	0%	0%	0%	0%
	28° C	0%	14%	18.67%	21.33%	23.33%
CH-56	24° C	0%	0%	0%	0%	0%
	28° C	0%	0%	9.33%	14%	35.67%

**Tabla N° 4: Crecimiento micelial diario de las cepas de *T. viride* sobre *B. cinerea* a 24° C y 28° C.**

Cepa	Temperatura/ Tiempo	24 H	48 H	72 H	96 H	120 H
CH-13	24° C	0mm	0mm	0mm	22.9mm	30.1mm
	28° C	9.8mm	22.63mm	26.36mm	41.53mm	64.4mm
CH-25	24° C	0mm	0mm	4.9mm	16.57mm	26.83mm
	28° C	0mm	6.53mm	19.83mm	33.37mm	68.6mm
CH-30	24° C	0mm	4.9mm	14.7mm	26.83mm	38.27mm
	28° C	0mm	9.8mm	17.97mm	40.13mm	68.37mm
CH-38	24° C	0mm	0mm	17.03mm	22.4mm	37.1mm
	28° C	0mm	8.4mm	26.83mm	44.8mm	65.1mm
CH-52	24° C	0mm	0mm	7.7mm	13.3mm	33.37mm
	28° C	0mm	6.53mm	21.63mm	36.63mm	65.1mm
CH-26	24° C	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
	28° C	0mm	9.8mm	21.7mm	36.4mm	65.1mm
CH-23a	24° C	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
	28° C	0mm	4.9mm	9.8mm	9.8mm	9.8mm
CH-27	24° C	0mm	0mm	0mm	9.8mm	20.3mm
	28° C	0mm	6.53mm	9.8mm	20.07mm	31.73mm
CH-35	24° C	0mm	0mm	0mm	9.8mm	22.3mm
	28° C	0mm	4.9mm	9.8mm	16.57mm	25.2mm
CH-36	24° C	0mm	0mm	0mm	15.4mm	22.9mm
	28° C	0mm	0mm	3.27mm	15.4mm	15.4mm
CH-24b	24° C	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
	28° C	0mm	9.8mm	13.07mm	14.93mm	16.33mm
CH-56	24° C	0mm	0mm	0mm	0mm	0mm
	28° C	0mm	0mm	6.53mm	9.8mm	24.97mm

En la tabla N° 3; las doce cepas de *T. viride* evaluadas a 24° C, tuvieron un PAO desde el 0 hasta el 54.67% sobre *B. cinerea* a las 120 horas de evaluación, siendo las cepas CH-13, CH-25, CH-30, CH-38 y CH-52 las que presentaron los mayores porcentajes de área ocupada sobre el patógeno con un 43, 38.33, **54.67**, 53 y 47.67% respectivamente; mientras que a 28° C, las

cepas de *T. viride* presentaron un PAO desde el 0 hasta el 98% sobre *B. cinerea*, alcanzando los mayores porcentajes de área ocupada las cepas CH-13, CH-25, CH-30, CH-38 y CH-52 con un 92, 98, 97.67, 93 y **93%** respectivamente.

En la tabla N° 4, el crecimiento micelial diario de las cepas de *T. viride* que presentaron los mayores porcentajes de área ocupada sobre *B. cinerea* a 24 y 28° C a las 120 horas, no fueron iguales en ninguna de éstas temperaturas. Así, a 24° C las cepas CH-13, CH-25, CH-30, CH-38 y CH-52 tuvieron un crecimiento micelial de **30.1, 26.83, 38.27, 37.1 y 33.37** mm/día; mientras que a 28° C, presentaron un crecimiento micelial de **64.4, 68.6, 68.37, 65.1 y 65.1** mm/día respectivamente.

De las cepas de *T. viride* que presentaron los mayores porcentajes de área ocupada sobre *B. cinerea* a 24 y 28° C; a 24° C, las cepas CH-25, CH-30, CH-38 y CH-52 tuvieron actividad antagonista desde las 72 horas, solo la cepa CH-13 presento antagonismo desde las 48 horas de evaluación; mientras que a 28° C, las cepas CH-25, CH-30, CH-38 y CH-52 tuvieron actividad antagonista desde las 48 horas, sólo la cepa CH-13 presento antagonismo desde las 24 horas de evaluación (Tabla N° 3).

El análisis estadístico se realizó con las cepas CH-13, CH-25, CH-30, CH-38 y CH-52 las cuales presentaron los mayores porcentajes de área ocupada en la temperatura y tiempo evaluados.

#### **5.2.1.- Análisis de varianza (ANOVA) y Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey**

Se realizó el Análisis de Varianza (ANOVA) y la Prueba de Comparaciones Múltiples de Tukey para determinar las diferencias de actividad antagónica entre las cepas seleccionadas y cuales de éstas presentaron mayor antagonismo contra *B. cinerea* a 24° C y a 28° C en los días evaluados en que hubo crecimiento de los antagonistas.

Se comprobó que si existe efecto de cada cepa de *Trichoderma viride* (CH-13, CH-25, CH-30, CH-38 y CH-52) en el porcentaje de área ocupada sobre *B. cinerea*, mediante el análisis de varianza (ANOVA) (Tabla N° 5).

El análisis de Comparaciones Múltiples de Tukey determinó que a 24° C, las cepas CH-30 y CH-38 de *T. viride* presentaron diferencias significativas con el porcentaje del área ocupada de las demás cepas CH-13, CH-25 y CH-52 sobre *B. cinerea* desde las 72 hasta las 120 horas de evaluación, donde la cepa CH-30 tuvo la mayor actividad antagonista con un 54.67% (Tabla N° 6); mientras que a 28° C, los porcentajes del área ocupada de las cepas CH-25 y CH-30 fueron estadísticamente diferentes con las demás cepas evaluadas a las 120 horas, donde la cepa CH-30 presento la mayor actividad antagonista con un 98% (Tabla N° 7).

**Tabla N° 5. Análisis de Varianza (ANOVA) Univariado de los niveles de la variable cepa de los aislamientos de *Trichoderma* a 24 y 28° C**

<i>Cepa</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Temperatura</i>	<i>F</i>	<i>Sig.</i>
CH-13	48, 72, 96, 120	24	16, 10.69, 48.89, 57.55 35.28, 9.86, 10.82, 50.79	0, 0, 0, 0 0, 0, 0, 0
CH-25				
CH30		28		
CH-38				
CH-52				

P< 0.05.

**Tabla Nº 6. Porcentaje del área ocupada (PAO) de las 5 cepas de *Trichoderma* enfrentadas al patógeno *Botrytis cinerea* Pers a 24° C.**

<i>Hongo Antagonist a</i>	<i>24 H</i> <i>X +/- DE Sig</i>	<i>48 H</i> <i>X +/- DE Sig</i>	<i>72 H</i> <i>X +/- DE Sig</i>	<i>96 H</i> <i>X +/- DE Sig</i>	<i>120 H</i> <i>X +/- DE Sig</i>
CH-13	0	0	0	29 +/- 0 a	43 +/- 0 a
CH-25	0	0	7 +/- 0 a	23.67 +/- 4.62 a	38.33 +/- 4.04 a
<b>CH-30</b>	0	9.33 +/- 4.04	21 +/- 0 b	38.33 +/- 4.04 b	<b>54.67 +/- 8.08 b</b>
<b>CH-38</b>	0	0	24.33 +/- 4.04 b	32 +/- 5.20 b	<b>53 +/- 13.45 b</b>
CH-52	0	0	11 +/- 0 a	19 +/- 8.66 a	47.67 +/- 4.04 a

Según Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) letras iguales en la misma columna no difieren los porcentajes estadísticamente entre sí. X = Promedio, DE = Desviación estándar, Sig = Significancia.

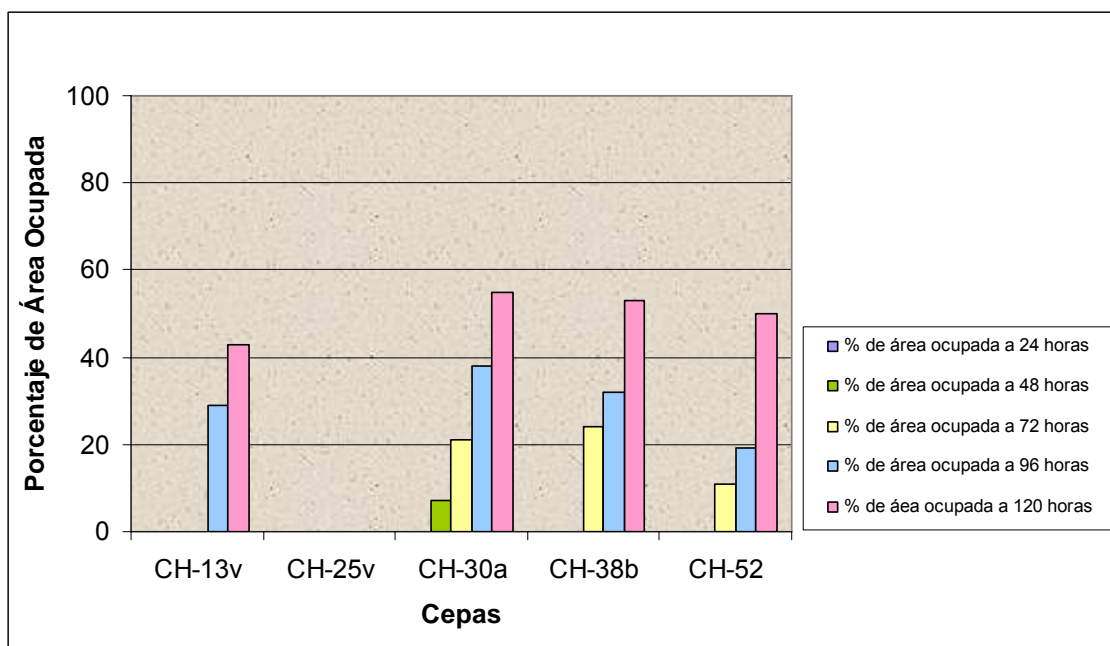
**Tabla Nº 7. Porcentaje del área ocupada (PAO) de las 5 cepas de *Trichoderma* enfrentadas al patógeno *Botrytis cinerea* Pers a 28° C.**

<i>Hongo Antagonista</i>	<i>24 H</i> <i>X +/- DE Sig</i>	<i>48 H</i> <i>X +/- DE Sig</i>	<i>72 H</i> <i>X +/- DE Sig</i>	<i>96 H</i> <i>X +/- DE Sig</i>	<i>120 H</i> <i>X +/- DE Sig</i>
CH-13	14 +/- 0	32.33 +/- 2.31 b	37.33 +/- 4.93 b	59.33 +/- 4.04 b	92 +/- 6.93 a
CH-25	0	9.33 +/- 4.04 a	28.67 +/- 13.28 a	54.33 +/- 14.43 a	97.67 +/- 4.04 b
<b>CH-30</b>	0	14 +/- 0 a	25.67 +/- 8.08 a	57.33 +/- 28.5 a	<b>98 +/- 3.46 b</b>
CH-38	0	11.67 +/- 4.04 a	38.33 +/- 4.04 b	64 +/- 12.12 b	93 +/- 12.12 a
CH-52	0	9.33 +/- 4.04 a	34.67 +/- 9.81 a	52.33 +/- 4.04 a	93 +/- 0 a

Según Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) letras iguales en la misma columna no difieren los porcentajes estadísticamente entre sí. X = Promedio, DE = Desviación estándar, Sig = Significancia.

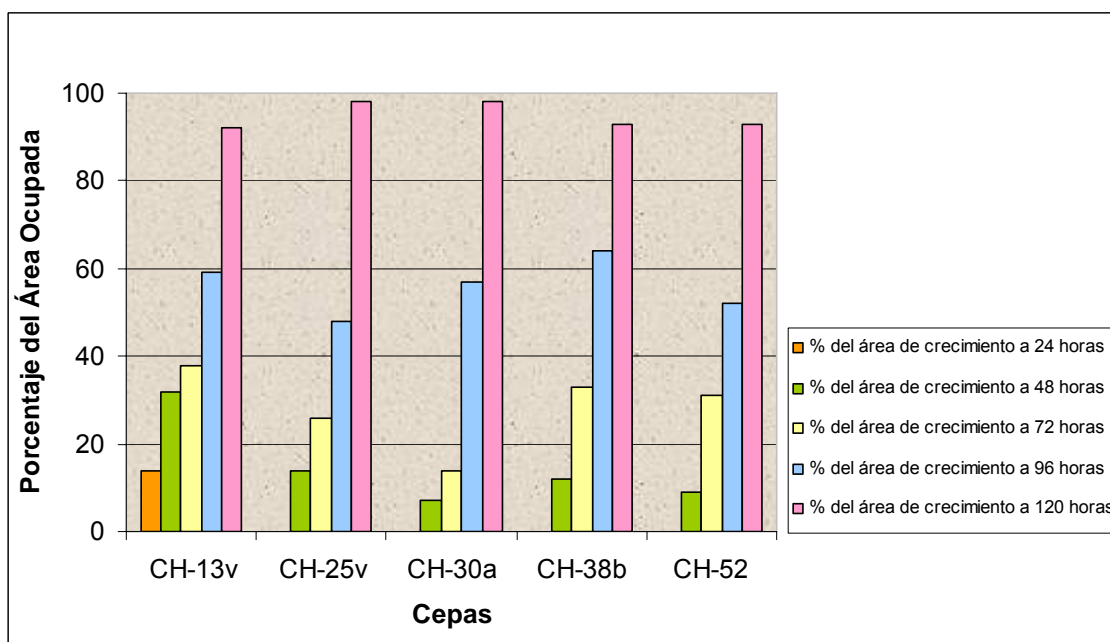
Estas diferencias en los porcentajes del área ocupada de las cepas de *T. viride* se observan en el siguiente gráfico:





**Figura N° 4. Porcentaje del Área Ocupada de las de cepas de *T. viride* sobre *B. cinerea* a 24° C**

Los porcentajes del área ocupada de las cepas CH-13, CH-25, CH-30, CH-38 y CH-52 de *T. viride* sobre *B. cinerea*, presentaron un crecimiento ascendente a 24° C, sin embargo la cepa CH-30 presentó el mayor PAO y la cepa CH-25 presentó el menor PAO a las 120 horas de evaluación.



**Figura N° 5. Porcentaje del Área Ocupada de las de cepas de *T. viride* sobre *B. cinerea* a 28° C**

Los porcentajes del área ocupada de las cepas CH-13, CH-25, CH-30, CH-38 y CH-52 de *T. viride* sobre *B. cinerea*, presentaron un crecimiento ascendente a 28° C, sin embargo las cepas CH-25 y CH-30 presentaron los mayores porcentajes del área ocupada y la cepa CH-13 presentó el menor PAO a las 120 horas de evaluación.

## VI.- DISCUSIÓN

### 6.1.- Aislamiento e identificación de especies nativas de hongos antagonistas en hojas infectas de vid

En el aislamiento de especies nativas de hongos antagonistas a partir de hojas infectadas de vid se identificó 12 cepas de la especie *Trichoderma viride* que representaron el 18% del total de aislados, sin embargo los hongos saprófitos *Fusarium* sp y *Alternaria* sp presentaron los mayores porcentajes con el 21 y 30% respectivamente (Tabla N° 1), debido a que las condiciones de necrosamiento favorecen en mayor grado su crecimiento.

### 6.2.- Evaluación de la capacidad antagónica de las cepas de *Trichoderma viride* contra *Botrytis cinerea* Pers

En la evaluación de la capacidad antagonista de las cepas de la especie *T. viride* sobre *B. cinerea* a través del método Precolonizado de Placas (Krauss e Ince, 1998) a 24° y 28° C (Tabla N° 3), se determinó que en ambas temperaturas sólo las cepas CH-13, CH-25, CH-30, CH-38 y CH-52 presentaron porcentajes significativos en el área ocupada sobre el hongo patógeno después de las 120 horas de evaluación, siendo éstos mayores en 38 y 92% a 24 y 28° C respectivamente. Por otro lado, las cepas CH-26, CH-23a, CH-27, CH-35, CH-36, CH-24b y CH-56 no presentaron actividades antagonistas significativas en ninguna de las temperaturas evaluadas.

Es posible que las cepas que no presentaron porcentajes significativos del área ocupada sobre *B. cinerea* se debiera a que el método Precolonizado de Placas no permitió evidenciar sus actividades antagonistas sobre el hongo patógeno, por el contrario las cepas que presentaron significativos porcentajes del área ocupada sobre el patógeno ejercieron el mecanismo de acción tipo micoparasitismo, cuya secuencia de pasos tales como: reconocimiento, ataque (enrollamiento), lisis y degradación celular del hospedero para adquirir los nutrientes (Bruce et al., 1995) fue observado microscópicamente, incluso se observó la formación de estructuras parecidas a ganchos, presumiblemente

apresorios, que probablemente permitieron la penetración de la hifa del antagonista en la célula del patógeno, característica reportada para el género *Trichoderma* (Elad et al., 1983) (Figura N° 14 y 15), así también mediante el estereoscopio se observó la colonización de *T. viride* sobre el patógeno con la consecuente muerte de las hifas de éste (Figura N° 13).

### **6.3.- Análisis de varianza (ANOVA) y Prueba de comparaciones múltiples de Tukey**

El análisis de varianza (ANOVA) (Tabla N° 5) determinó que si existe efecto de cada cepa de *Trichoderma viride* (CH-13, CH-25, CH-30, CH-38 y CH-52) en el porcentaje de área ocupada sobre *B. cinerea*, debido a que todas las cepas fueron capaces de reconocer al patógeno mediante una interacción de carbohidrato – lectina, siendo el primer paso que proveyó las bases para la interacción específica y el detonante de una cascada de eventos que se dirigieron hacia la destrucción del hospedero (Inbar.. y Chet, 1997); y que esta actividad antagonista presentó un crecimiento ascendente en ambas temperaturas evaluadas (Figura N° 1 y 2), debido a que la temperatura favoreció el crecimiento de las hifas de la cepas desde el inóculo inicial, permitiendo el contacto físico con el patógeno, condición necesaria en el micoparasitismo, en la síntesis y velocidad de reacción de las exoenzimas hidrolíticas que facilitaron la degradación de la pared celular del hospedero (Manocha, 1991; Bruce et al., 1995) para adquirir sus nutrientes. Los porcentajes del área ocupada de éstas cepas sobre *B. cinerea* fueron mayores a 28° C (98%) frente a lo alcanzado a 24° C (54.67%) hasta las 120 horas de evaluación. Siendo la temperatura óptima para la actividad micoparasítica de estas cinco cepas alrededor de los 28° C, ya que esta temperatura favoreció un mayor crecimiento de sus hifas, el aumento de la síntesis y velocidad de reacción de las exoenzimas hidrolíticas.

El análisis de Comparaciones Múltiples de Tukey determinó que a 24° C, las cepas CH-30 (54.67%) y CH-38 (53%) de *T. viride* presentaron diferencias significativas con el porcentaje del área ocupada de las demás cepas CH-13, CH-25 y CH-52 sobre *B. cinerea* desde las 72 hasta las 120 horas de

evaluación, donde la cepa CH-30 tuvo la mayor actividad antagonista con un 54.67% (Tabla N° 6); mientras que a 28° C, los porcentajes del área ocupada de las cepas CH-25 (97.67%) y CH-30 (98%) fueron estadísticamente diferentes con las cepas CH-13, CH-38 y CH-52 a las 120 horas, donde la cepa CH-30 presento la mayor actividad antagonista con un 98% (Tabla N° 7).

Las diferencias de los porcentajes del área ocupada de las cepas evaluadas en ambas temperaturas, se debe a características intrínsecas de cada una de ellas sobre el patógeno en su capacidad de reconocer, atacar, lisar y degradar las células del hospedero.

Las cepas de *Trichoderma viride* mostraron actividad antagonista sobre el patógeno *B. cinerea* mediante el mecanismo de acción del tipo micoparasitismo a 24° y 28° C, al igual que Betalleluz (2003) mencionó que *T. viride* ejerció antagonismo contra *Phytophthora infestans* a través de diferentes mecanismos de acción como el micoparasitismo y antibiosis que se vieron afectados por la temperatura. Así mismo, Torres et al. (2008) reportaron a *T. viride* capaz de controlar a *Cladosporium fulvum*, a través del micoparasitismo, con un 97.5% de área ocupada sobre el patógeno, similar porcentaje de área ocupada de la cepa CH-30 (98%) sobre *B. cinerea* a 28° C.

## VII.- Conclusiones

- 1.- De 66 hongos aislados a partir de hojas infectadas con *Botrytis cinerea* Pers, 18% (12) correspondieron a cepas de *Trichoderma viride*.
- 2.- De las doce cepas de *T. viride*, evaluadas a través del método precolonizado de placas, sólo cinco cepas (CH-13, CH-25, CH-30, CH-38 y CH-52) presentaron los mayores porcentajes de área ocupada sobre *B. cinerea* Pers, presentando valores máximos del 54.67% y 98% a 24° C y 28° C respectivamente, en comparación con las siete cepas evaluadas.
- 3.- Las cinco cepas de *T. viride*: CH-13, CH-25, CH-30, CH-38 y CH-52 presentaron antagonismo del tipo micoparasitismo sobre *B. cinerea* Pers.
- 4.- Las temperaturas de 24° C y 28° C permitieron el crecimiento de las cinco cepas de *T. viride* que presentaron los mayores porcentajes de área ocupada sobre *B. cinerea* Pers, sin embargo a 28° C hubo crecimiento óptimo de las cinco cepas evaluadas con una interacción antagónica eficiente frente al patógeno.
- 5.- A 24° C, las cepas CH-30 y CH-38 presentaron los mayores porcentajes de área ocupada sobre *B. cinerea* Pers con un 54.67% y 53% respectivamente.
- 6.- A 28° C, las cepas CH-25 y CH-30 presentaron los mayores porcentajes de área ocupada sobre *B. cinerea* Pers con un 97.67% y 98% respectivamente.
- 7.- Se concluye que la cepa CH-30 presentó el mayor porcentaje de área ocupada sobre *B. cinerea* Pers tanto a 24° C y a 28° C con el 54.67% y 98% respectivamente.

## VIII.- ILUSTRACIONES



**Figura N° 6**  
Colonia de *T. viride* CH-13 en PDA



**Figura N° 7**  
Colonia de *T. viride* CH-25 en PDA



**Figura N° 8**  
Colonia de *T. viride* CH-30 en PDA



**Figura N° 9**  
Colonia de *T. viride* CH-38 en PDA



**Figura N° 10**  
Colonia de *T. viride* CH-52 en PDA

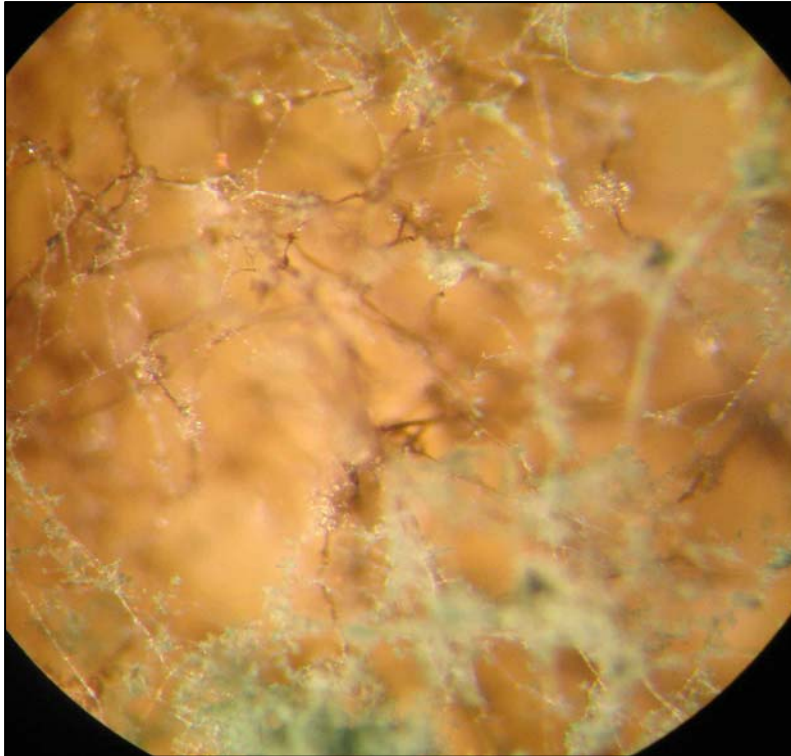


**Figura Nº 11**  
Conidióforo y fiálides de *T. viride* a 40X

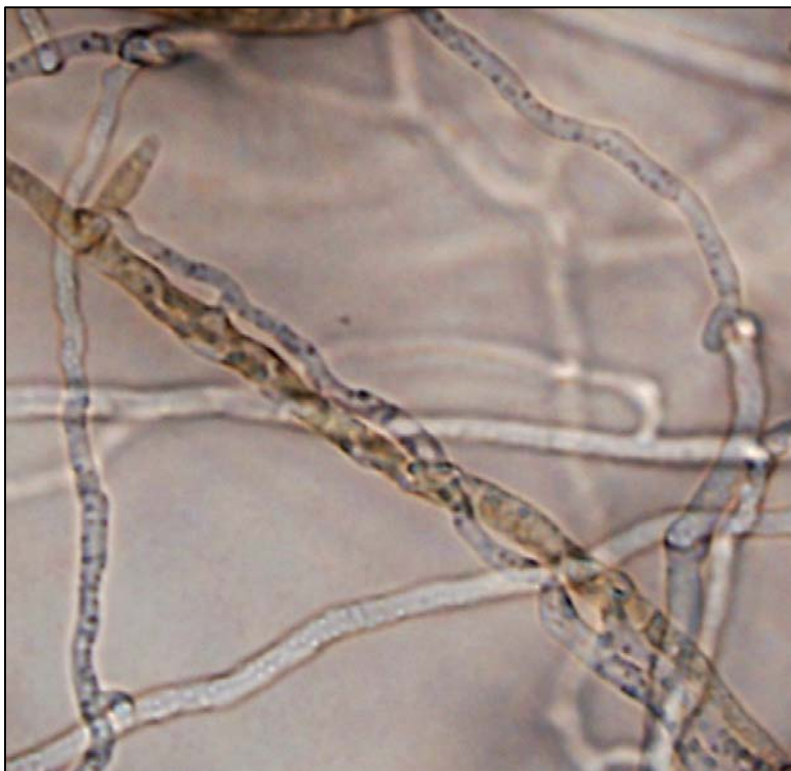


**Figura Nº 12**  
Conidióforo, fiálides y Conidias de *T. viride* a 60X

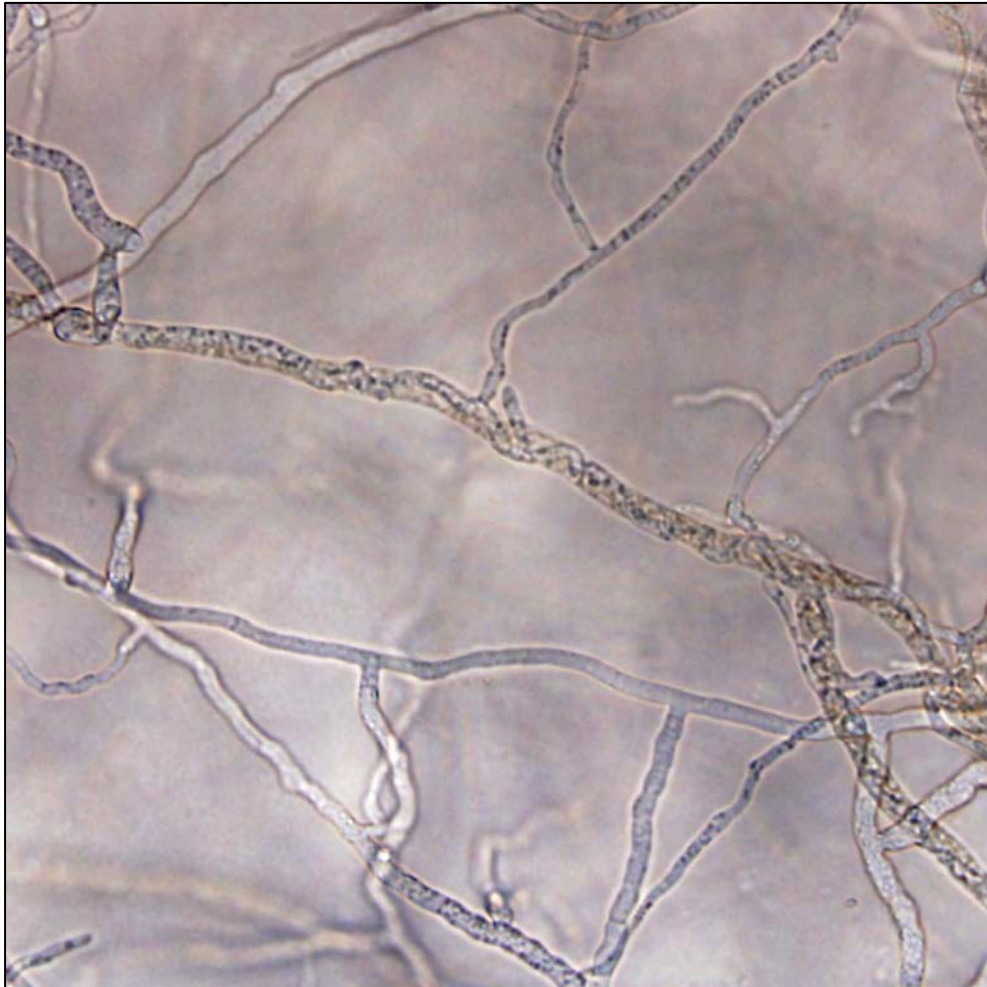




**Figura N° 13**  
Vista al estereoscopio del micoparasitismo de *T. viride* sobre *B. cinerea* a 53X



**Figura N° 14**  
Formación de ganchos o haustorios por *T. viride* sobre la hifa de *B. cinerea* a 40X



**Figura N° 15**  
Enrollamiento de la hifa de *T. viride* sobre la hifa de *B. cinerea* a 40X

## IX. - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, P. 1990. The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. Annual Review of Phytopathology 28, 59 - 72

Alexopoulos, C. & Mims, C. 1979. Introductory mycology (3era edición). New York: Wiley.

Andrews, J. 1990. Biological control on the phyllosphere. Realistic goal or false hope?. Canadian Journal of Plant Pathology 12, 300 – 307.

Baker, K. 1965. Biological Control of the Phylloplane. The American Phytopathological Society.

Baker, K., Cook, R. J. 1974. Biological control of plant pathogens. Freeman, San Francisco: CRC Press.

Baker, K. 1981. Biological control. In Fungal wilt Diseases of plants, ed. M. E. Mace, A. A. Bell, C. H. Beckman, pp. 523 – 561. New York: Academic. 640 pp.

Baker, R., Elad, Y., Chet, I. 1984. The controlled experiment in the scientific method with special emphasis on biological control. Phytopathology 74, 1019 – 1021.

Baker, R., & Griffin, G. 1995. Novel approaches to integrated pest management. En: R. Reuveni (Ed). Molecular strategies for biological control of fungal plant pathogens (pp. 153 – 182). Boca Raton, Florida: CRC Press.

Barak, R., Elad, Y., Mirelman, D., Chet, I. 1985. Lectins: A possible basis for specific recognitions in the interactions of *Trichoderma harzianum* and *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology 75, 458 – 462.

Barnett, H. & Binder, F. 1973. The fungal host – parasite relationship. Annual Review of Phytopathology 11, 273 – 292.

Barnett, H. & Barry, G. 2006. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. The American Phytopathological Society St. Paul, Minnesota

Bastos, C. 1996. Mycoparasitic nature of the antagonisms between *Trichoderma viride* and *Crinipellis perniciosus*. Fitopatología Brasileira 21, 50 – 54.

Batra, S. 1982. Biological control in agroecosystems. Science 215, 134 – 139.

Benhamou, N. & Chet, I. 1997. Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythium ultimum*. Applied and Environmental Microbiology 63, 2095 – 2099.

Betalleluz, V. 2003. Control microbiológico de *Phytophthora infestans* en el tomate a través de hongos antagonistas (*Trichoderma harzianum*, *T. lignorum*, *T. viride* y *Gliocladium virens*) bajo condiciones controladas. Tesis (Título de Licenciado en Biología) – Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanda.

Bisiach, M., Minervini, G., Vercesi, A., 1984. Biological and epidemiological aspects of the kiwifruit (*Actinidia chinensis* Planchon) rot, caused by *Botrytis cinerea* Pers. Rivista Di Patologia Vegetale 20: 38–55.

Blakeman, J. & Fokkema, N. 1982. Potencial for biological control of plant diseases on the Phylloplane. Annual Review of Phytopathology, 20 167 – 192.

Bruce, A., Srinivasa, U., Staines, H., Highley, T. 1995. Chitinase and laminarinase production in liquid culture by *Trichoderma* spp and their role in biocontrol of wood decay fungi. International Biodeterioration & Biodegradation, pp. 337 – 353.

Bruneton, J. 1991. Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia. Edit. Acribia S.A. Zaragoza. España.

Bullit, J. & Dubos, B. 1988. Botrytis bunch rot and blight. In: R.C. Pearson and A.C. Goheen (Edts.). Compendium of Grapes Diseases. p.13-15. The American Phytopathological Society. St. Paul, Mn.

Cazorla, F., Torés, J., Olalla, I., Perez-García, A., Farré, J., De Vicente, A. 1998. Bacterial apical necrosis of mango in Southern Spain: a disease caused by *Pseudomonas syringae* p.v. *syringae*. *Phytopathology* 88, 614 – 620.

Caldwell, R. 1958. Fate of spores of *Trichoderma viride* Pers. Ex Fr. Introduced into soil. *Nature* 181: 1144 – 1145.

Chang, Y., Baker, R., Kleifield, O., Chet, I. 1985. Increased growth of plant induced by the biological control and *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease* (in Press.)

Chet, I., Hadar, Y., Elad, J., Henis, Y. 1979. Biological control of soil-borne plant pathogens by *Trichoderma harzianum*. In *Soil-Borne Plant Pathogens*. Academic London. Pp 587-592.

Chet, I., Harman, G., Baker, R. 1981. *Trichoderma hamatum*: its hyhal interactions with *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. *Microbial Ecology*, 7: 9-38.

Chet, I., Inbar, Y., Hadar, Y. 1997. The Mycota IV. Environmental and microbial relationships. En: A. wicklow, D. Soderstron (Eds). *Fungal antagonistics and mycoparasites*. (pp. 165 – 184) Berlin: Springer – Verlag.

Collins, R. & Halim, A. 1972. Characterization of the mayor aroma constituents of the fungus *Trichoderma viride* Pers. *Journal of Agricultural and food chemistry* 20, 437 – 438.

Cooney, J., Lauren, D., Jensen, D., Perry – Mayer, L. 1997. Effect of solid sbstrate, liquid supplement and harvest time on 6-n-pentyl-2h-pyran-2 one (6 PAP) production by *Trichoderma* spp. *Journal of Agricultural and food chemistry* 45, 531 – 534.

Cooney, J. & Lauren, D. 1999. Biotransfotmation of the *Trichoderma* metabolite 6-n-pentyl-2h-pyran-2-one (6PAP) by selected fungal isolates. *Journal of Natural Products* 62, 681 – 683.

Cutler, H., Cox, R., Crumley, F., Cole, P. 1986. 6-pentyl- $\alpha$ -pyrona from *Trichoderma harzianum*: its plant growth inhibitory and antimicrobial properties. *Agricultural and Biological Chemistry* 50, 2943 – 2945.

Cutler, H. & Hill, R. 1994. Natural fungicides and their delivery systems as alternative to synthetics. En Wilson, C. L. Wisniewski, M.E. (Eds) *Biological Control of postharvest disease. Theory and practice* (pp. 135 – 152) Kearneysville, W.V.: US. Department of Agriculture.

Davet, P. 1979. Technique pour l'analyse des population de *Trichoderma* et de *Gliocladium virens* dans le sol. *Ann. Phytopathol.* 11: 529-533.

Davet, P. 1981. Effects de quelques pesticides sur la colonisation d'un substrat par le *Trichoderma harzianum* Rifai en présence des autres champignons du sol. *Soil Biol. Biochem.* 13: 513 – 517.

Danielson, R., Davey, C. 1973. Effects of nutrients and acidity on phialospore germination of *Trichoderma* in vitro. *Soil Biol. Biochem.* 5, 517 – 524.

Decendit, A. & Merillon, J. 1996. Condensed tannin and anthocyanin production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Plant cell reports* 15:762 765.

Deacon, J. 1991. Significance of ecology in the development of biocontrol agents against soil-borne pathogens. *Biocontrol Science Technology* 1: 5 – 20.

De Marco, J., Lima, L., De Sousa, M., Felix, C. 2000. A *Trichoderma harzianum* chitinase destroys the cell wall of the phytopathogen *Crinipellis perniciosus*, the causal agent of witches' broom disease of cocoa : *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 16, 383 – 386.

Dissevelt, M. & Ravensberg, W., 2002. The effect of cultural and environmental conditions on the performance of *Trichoderma harzianum* strain T-22. *Bulletin OILB/SROP* 25, 49–52.

- Doi, Y. 1972. Revision of the Hypocreales with culture observations. 4. the genus *Hypocrea* and its allies in japan. 2. Enumeration of the species. Bull. Natl. Sci. Mus. 15, 649 – 751.
- Domsch, K., Gams, W., Anderson, T. 1980. Compendium of soil fungi. Vol 1 London: Academic. 859 pp.
- Dubos, B., Bulit, J., Bugaret, Y., Verdu, D. 1978. The possibilities of using *Trichoderma viride* for the biological control of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola* on grapevines. Comptes Rendus des Seances de l'Academie d'Agriculture de France 14, 1159–68.
- Elad, Y., Chet, I., Katan, J. 1980. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. Phytopathology, 70: 119-121.
- Elad, Y., Hadar, Y., Chet, I., Henis, Y. 1981. Biological control of *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* in carnation. Plant Disease 65: 675-677.
- Elad Y., Chet, P., Henis, Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. Scanning electron microscopy and fluorescence microscopy. Phytopathology 73: 85-88
- Elad, Y. 2000a. *Trichoderma harzianum* T39 preparation for biocontrol of plant diseases-control of *Botrytis cinerea* *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium fulvum*. Biocontrol Science and Technology. 10: 499-507
- Elad, Y. 2000b. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. Crop Protection. 19: 709-714.
- Elad, Y. & Shtienberg, D. 2000. Management of humidity-promoted disease in non-heated greenhouse by means of fenhexamide, *Trichoderma harzianum* T39 and integrated control according to GREENMAN. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer, in press.

Ellis, M. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Wallingford, UK: CAB International. Ellis MB, Waller JM, 1974. *Sclerotinia fuckeliana* (conidial state: *Botrytis cinerea*). CMI Description of pathogenic fungi and bacteria, No. 341.

Elmer, P., Reglinski, T., Wood, P., Hill, R., Marsden, S., Parry, F., Taylor, J. 2003. Suppression of *Botrytis* in grapes using a combination of elicitors and fungal antagonists. In: Proceedings of the 8th International Congress of Plant Pathology, Christchurch, New Zealand. (Abstract 43.)

Emmett, R. & Nair, M. 1991. *Botrytis* bunch rot of grapes in Australia. Australian Grapegrower and Winemaker 33: 19–21.

Fokkema, N. 1983. Naturally – occurring biological control in the phyllosphere. Les antagonismes microbiens. Les Colloques de L' INRA 18, 71 -79.

Fravel, D. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. Annual Review of Phytopathology 26, 75 -91.

French, E., Hebert, T. 1982. Métodos de Investigación en Fitopatología. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura San José, Costa Rica: IICA.

Fry, W. & Milgroom, M. 1990. Managing resistance to agrochemicals. En: Green, M., LeBaron, H y Moberg, W (Eds) Population biology and management of fungicide resistance (pp. 275 – 285). Washington: American Chemical Society.

Galet, P. 1984. Recherches sur les methods d'identification et de classification des vitacées des iones tempérées. Facultad de Ciencias. Montpellier. 2do tomo. 525 pp.

Gangawane, L. 1997. Management of fungicide resistance in plant pathogens. Indian Phytopathology 50, 305 – 315.



Garret. S. 1965. Ecology of soil-borne plant pathogens. Prelude to biological control. En: Baker, F., y Snyder, W. (Eds). Toward biological control of soil-borne plant pathogens (pp. 4 – 17), California: University California Press.

Godtfredsen, W. & Vangedal, S. 1965. Trichodermin, a new sesquiterpene antibiotic, Acta. Chem. Scand., 19, 1088.

Goldman, G., Hayer, C., Harman, G. 1994. Molecular and Cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. Biotechnology Tibtech 12, 478 – 482.

Guetsky, R., Shtienberg, D., Elad, Y., Dinoor, A. 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. Phytopathology 91: 621-627.

Hadar, Y., Chet, I., Henis, Y. 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 69: 64-68

Hadar, Y., Harman, G., Taylor, A. 1984. Evaluation of *Trichoderma koningii* and *T. harzianum* from New York soils for biological control of seed rot by *Pythium* spp. Phytopathology 74: 106-110

Handelsman, J. & Parke, J. 1989. Plant Microbe Interactions. En: Kosuge, T., y Nester, E. W. (Eds). Mechanism in biocontrol of soilborne plant pathogens (pp. 27-61). New Cork: McGraw-Hill.

Harman, G., Chet, I., Baker, R. 1980. *Trichoderma harzianum* effects on seed and seedling disease induced in radish and pea by *Pythium* spp or *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 70: 1167-1172

Harman, G., Chet, I., Baker, R. 1981. Factors affecting *Trichoderma hamatum* applied to seeds as a biocontrol agent. Phytopathology 70: 569-572.

Harman G., Latorre, B., Agosin, E., San Martin, R., Riegel, D., Nielsen, P., Tronsmo, A., Pearson, R. 1996. Biological and integrated control of *Botrytis* bunch rot of grape using *Trichoderma* spp. Biological Control 7, 259–66.

Harman, G., 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. Plant Disease 84, 377–93.

Henis, Y., Adams, P., Lewis, J., Papavizas, C. 1983. Penetration of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma* spp. Phytopathology 73, 1043 – 1046.

Hidalgo, L. 2002. Tratado de Viticultura General. Editorial Mundi Prens Barcelona. 3era edición. 500pp.

Ho, C. 2000. Spider-mite problems and control in Taiwán. Experimental & Applied Acarology 24, 453 – 462.

Holz, G., Coertze, S., Basson, E. 1997. Latent infection of *Botrytis cinerea* in grape pedicels leads to postharvest decay. Phytopathology 87, S43.

Holz, G. & Volkmann, A., 2002. Colonization of different positions in grape bunches by potential biocontrol organisms and subsequent occurrence of *Botrytis cinerea*. Bulletin IOLB/SROP 25, 9–12.

Howell, C., Stipanovic, R., Lumsden, R. 1993. Antibiotic production by strains of *Gliocladium virens* and its relation to the biocontrol of cotton seedling diseases. Biocontrol Science & Technology 3, 435 – 441.

Howell, C., Hanson, L., Stipanovic, R., Puckhaber, L. 2000. Introduction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. Phytopathology 90: 248 – 252.

Inbar, J., Abramsky, M., Cohen, D., Chet, I. 1994. Plant grow enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grow under commercial conditions, European Journal of Plant Pathology. 100: 337-346.

Inbar, J. & Chet, I. 1997. Lectins and biocontrol. Critical Reviews in Biotechnology 17, 1 – 20.

Jackson, R. 1965. Antibiosis y fungistasis of soil microorganisms. *In* Ecology of Soil - Borne Plant Pathogens. R. W. Baker and W. C. Snyder Eds. University of California press, Berkeley, Los Angeles. 571 pp.

Jarvis, W. 1962. The infection of strawberry and raspberry fruits by *Botrytis cinerea* Fr. *Annals of Applied Biology*, 50:569-575.

Jarvis, W. 1997. *Botryotinia* and *Botrytis* Species: Taxonomy, Physiology and Pathogenicity. Monogr. 15. Canada Department of agriculture, Ottawa, Ontario. 195 pp.

Jensen, D. & Wolffhechel, H. 1995. Biological control: Benefits and Risks. (Series: Plant and microbial biotechnology research. En: M.T.H., Heikii y J.M. Lynch (Eds). The use of fungi, particularly *Trichoderma* spp and *Gliocladium* spp, to control root rot and damping-off diseases (pp. 177-189). Cambrige; Cambrige University Press.

Kars. I., Van Kan, J. 2004. Extracellular enzymes and metabolites involved in pathogenesis of *Botrytis*. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N, eds. *Botrytis*: Biology, Pathology and Control. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer. Academic Publishers, 99–118.

Keller, M., Viret, O., Cole, M. 2003. *Botrytis cinerea* infection in grape flowers: defense reaction, latency and disease expression. *Phytopathology* 93: 316–22.

Kommedahl, T., Windels, C., Sarbini, G., Wiley, H. 1981. Variability in performance of biological and fungicidal seed treatments in corn, peas and soybeans. *Prot. Ecol.* 3: 55-61

Kookana, R. & Simpson, B. 2000. Pesticide fate in farming systems: Research and monitoring. *Communications in Soil Science & Plant Analysis* 31: 1641 – 1659.

Krauss, U. & Ince, J. 1998. Isolation preliminary evaluation of mycoparasites as biocontrol agents of crown roto f banana. *Biological Control* 13: 111-119

Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Sammuels, G., Meyer, W., Kubicek, C., Borner, T. 1997. Revision of *Trichoderma* sect. Longibrachiatum including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia* 89, 442 – 460.

Latorre, B. 1986. Manejo de *Botrytis cinerea* en uva de mesa. *Revista Frutícola* (Chile) 7: 75-88.

Latorre, B. & Vásquez, G. 1996. Situación de *Botrytis cinerea* latente en uva de mesa de la zona Central. *Aconex* (Chile) 52:16-21.

Latorre, B., Agosin, E., Martin, R., Vasquez, G., San Martin, R. 1997. Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzianum* produced by liquid fermentation against *Botrytis* bunch rot of table grape in Chile. *Crop Protection* 16: 209–214.

Latorre, B., Lillo, C., Rioja M. 2001. Eficacia de los tratamientos fungicidas para el control de *Botrytis cinerea* de la vid en función de la época de aplicación. *Cien. Inv. Agr.* (Chile) 28: 61-66.

Latorre, B. & Rioja, M. 2002. Efecto de la temperatura y de la humedad relativa sobre la germinación de conidias de *Botrytis cinerea*. *Cien. Inv. Agr.* (Chile) 29:67-72.

Lewis, J. & Papavizas, G. 1984. Chlamydospore of *Trichoderma* spp in natural substrate. *Can. J. Microbiol.* 30: 1 – 7.

Lieckfeldt, E. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. En: C.P. Kubicek y Harman, G. (Eds). *Molecular Taxonomy of Trichoderma and Gliocladium and their teleomorphs* (pp. 35-56). London: Taylor & Francis Ltd.

Lindow, S. & Wilson, M. 1998. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. En J. Davies (Ed.). *Strategies for implementation of biological control of foliar pathogens and pests with bacterial biocontrol agents* (pp 1-18) 2da Ed. Berkeley: California University Press.

Lock, O. 1997. Colorantes Naturales. Edit. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima. Perú.

Lockwood, R. 1977. Fungistasis in soils. Biol. Rev. 52: 1 – 43.

Manocha, M. 1991. Handbook of applied mycology I: Soil and Plants. En Arora, D.K., Rai Mukerji, K. y Knudsen, G., (Eds). Physiology and biochemistry of biotrophic mycoparasitism (pp. 273 – 300). New York: Merced-Dekker, Inc.

Margolles-Clark, E., Hayer, C., Harman, G., Ventila, M. 1996. Improved production of *Trichoderma harzianum* endochitinase by expression in *Trichoderma reesei*. Applied and Environmental Microbiology 62, 2145 – 2151.

McClellan, W. & Hewitt, W. 1973. Early Botrytis rot of grapes: Times of infection and latency of Botrytis cinerea Pers. in Vitis vinifera L. Phytopathology 63: 1151-1157.

Ministerio de Agricultura, 2008. <http://www.minag.gob.pe/home.php>.

Mitchell, C. & Dix, N. 1975. Growth and germination of *Trichoderma* spp under the influence of soil fungistasis. Trans. Br. Mycol. Soc. 64: 235 – 241.

Naár, Z. & Keskés, M. 1995. A method for selecting *Trichoderma* strains antagonistics against *Sclerotinia minor*. Microbiological Research 150, 239 – 246.

Nair, N. & Hill, G. 1992. Bunch rot of grapes caused by *Botrytis cinerea*. In: Kumar J, Chaube HS, Singh US, Mukhopadhyay AN, eds. *Plant Diseases of International Importance*, Vol. III: Diseases of Fruit Crops. Englewood Cliffs, NJ, USA: Prentice Hall, 147–69.

Nair, N. & Parker, F. 1985. Midseason bunch rot of grapes: an unusual disease phenomenon in the Hunter Valley, Australia. Plant Pathology 34, 302–5.

Nelson, E. 1991. Handbook of Applied Mycology. Volume 1: Soil and Plants. En Arora, D. K., Rai, B., Mukerji, K. G., Knudsen, G. R. (Eds). Current limits to biological control of fangal phytopathogens (pp: 327-355).

Nunan, K., Sims, I., Bacic, A., Robinson, S., Fincher, G. 1998. Changes in cell wall composition during ripening of grape berries. Plant Physiology 118, 783–92.

O'Keeffe, M. & Farell, F. 2000. The importance of chemical residues as a food safety issue. Irish Journal of Agricultural & Food Research 39, 257 – 264.

O' Nelly, T., Elad, Y., Shtienberg, D., Cohen, A. 1996. Control of grapevine grey mould with *Trichoderma harzianum* T 39. Biological Sci. Technol. 6: 139 – 146.

Pan, S., Ye, X., Kuc, J. 1992. Induction of chitinases in Tobacco plants systemically protected against blue mold by *Peronospora tabacina* or Tobacco Mosaic Virus. Phytopathology 82, 119 – 123.

Papavizas, G. & Lumsden, R. 1980. Biological control of soilborne fangal propagules. ANN. Rev. Phytopathol. 18: 389 – 413.

Papavizas, G. 1981. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in pea and bean rhizospheres. Phytopathology 71: 121 – 125.

Papavizas, G., Lewis, J., Abd-El Moity, T. 1982. Evaluation of new byotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities. Phytopathology 72, 126-132

Papavizas, G. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. Annual Review of Phytopathology 23: 23 – 54.

Parkinson, D. & Waid, J. 1960. The Ecology of Soil Fungi- Liperpool University Press.

Parkinson, D., Taylor, G., Pearson, R. 1963. Studies on fungi in the root region. I. The development of fungi on young roots. Plant Soil 19, 322 – 349.

Pearson, R. 1974. The genus *Trichoderma*. American Phytopathological Society Press.

Pearson, R. 1988. Compendium of Grape Disease. American Phytopathological Society Press. 13 pp.

Pezet, R. & Pont, V. 1992. Differing biochemical and histological studies of two grape cultivars in the view of their respective susceptibility and resistance to *Botrytis cinerea*. In: Verhoeff K, Malathrakakis NE, Williamson B, Eds. Recent Advances in *Botrytis* Research. Wageningen, The Netherlands: Pudoc Scientific Publishers, 93–8.

Ribamar, S. & De Oliveira, N. 1998. *In Vitro* antagonistic potencial of *Trichoderma* spp against *Colletotrichum gloeosporioides* agent of anthracnose in the passion fruit (*Passiflora*). Boletín Micológico 13: 103 – 110.

Rifai, M. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. Mycological Papers 116, 1 – 56.

Rodríguez-Kabana, R., Kelley, W., Curl, E. 1978. Proteolytic activity of *Trichoderma viride* in mixed culture with *Sclerotium rolfsii* in soil. Can. J. Microbiol. 24: 487.

Rossmann, A., Samuels, G., Rogerson, C., Lowen, R. 1999. Genera of Bionectriaceae, Hypocreaceae and Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes). Stud. Mycol. 42, 1 – 248.

Ruesta, A. & Rodríguez, R. 1992. Manual Cultivo de la Vid en el Perú. Segunda Edición. Ediciones FUNDEAGRO. 15, 39, 161, 173 pp.

Samuels, G. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. Mycological Research. 100: 923-935.

Saksena, S. 1960. Effects of carbon disulfide fumigation on *Trichoderma viride* and other soil fungi. Trans. Br. Mycol. Soc. 43:111.

Sesan, T., Oprea, M., Podosu Cristescu, A., Tica, C., Oancea, F. 1999. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on grapevine with *Trichoderma* spp. and *Saccharomyces chevalieri*. Bulletin of the Polish Academy of Biological Sciences 47: 197–205.

Seyb, A. 2004. *Botrytis cinerea* inoculum sources in the vineyard system. Lincoln, NZ: Lincoln University, PhD Thesis.

Sivan, A., Elad, Y., Chet, I. 1984. Biological control effects of a new isolate of *Trichoderma harzianum* on *Pythium aphanidermatum*. Phytopathology 74: 498-501

Sivan, A. & Chet, I. 1985. Biological control of *Fusarium* spp in cotton, wheat and musk melon by *Trichoderma harzianum*. Photophath 2 (in press).

Stefanova, N. & Sandoval, R. 1995. Efectividad de biopreparados de *Trichoderma* spp, en el control de fitopatógenos de suelo. Boletín Técnico CIV INISAV 2, 10 -22. Subramanian, C. 1983. Hyphomycetes: Taxonomy and Biology (1era Ed.). New York: Academic Press.

Subramanian, C. 1983. Hyphomycetes; Taxonomy and Biology (1era Ed.). New York: Academic Press.

Sutton, J. 1991. Alternative methods for managing grey mold of strawberry. In: Dale A, Luby JJ, eds. The Strawberry Into the 21st Century: Proceedings of the Third North American Strawberry Conference, Texas, USA. Portland, OR, USA: Timber Press, 183–90.

Thomas, A., Kotze, J., Matthee, F., 1983. Development of a technique for the recovery of soilborne sclerotia of *Botrytis cinerea*. Phytopathology 73, 1374 – 1376.

Torres, E., Iannaccone, J., Gómez, H. 2008. Biocontrol del Moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. Bragantia, Campinas 67 (1), 169 – 178.



- Vázquez-Garcidueñas, S., Leal-Morales, C., Herrera-Estrella, A. 1998. Análisis of the  $\beta$ -1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology 64, 1442 – 1446.
- Weindling, R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasitic of other soil fungi. Phytopathology, 22: 837-845
- Wells, H., Bell, D., Jawoeski, C. 1972. Efficacy of *Trichoderma harzianum* as biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. Phytopathology 62: 442-447.
- Wilson, M. 1997. Biocontrol of aerial plant diseases in agriculture and horticulture: current approaches and future prospects. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 19: 188 – 191.
- Widden, P. & Abitbol, J. 1980. Seasonality species in a spruce forest soil. Mycologia 72, 775 – 784.
- Whipps, J. 1992. Status of biological disease control in horticulture. Biocontrol Science Technology 2, 3 – 24.
- Windels, C. & Lindow, S. 1985. Biological control on the Phylloplane (1era Ed.). St. Paul MN: American Phytopathological Society.
- Wu, W. 1982. Seed treatment by applying *Trichoderma* spp to increase the emergence of soybeans. Seed Sci. Technol. 10: 557-563.
- Yedidia, I., Benhamou, N., Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology 65, 1061 – 1070.
- Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y., Chet, I. 2000. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203. Plant Physiol. Biochem 38; 863 – 873.

## X. – ANEXOS

### ANEXO Nº 1

#### Diagrama del Método Precolonizado de Placa (Krauss e Ince, 1998)

